

# **Klonierung und funktionelle Expression eines Cytokininrezeptors aus *Cucurbita maxima*-Keimlingen**

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat)  
genehmigte

**Dissertation**

von Sabine Schmidtke  
aus Kiel

1. Referent:

Prof. Dr. Theo Lange

2. Referent:

Prof. Dr. Klaus Harter

eingereicht am:

31. August 2005

mündliche Prüfung (Disputation) am:

22. November 2005

2006 (Druckjahr)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Die Funktion der Cytokinine in der pflanzlichen Entwicklung . . . . .	9
1.2 Zwei-Komponenten regulatorische Systeme in Pflanzen . . . . .	12
1.3 Der Hefe-Komplementierungstest als Beweis für die Rezeptortätigkeit . .	18
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Anzucht von Pflanzenmaterial . . . . .	21
2.1.1 Pflanzenmaterial und Klimakammern . . . . .	21
2.1.2 Pflanzgranulat, Nährlösungen, Wuchs- und Hemmstoffe . . . . .	22
2.1.3 Behandlung des Pflanzenmaterials . . . . .	23
2.2 Bakterienstämme, Hefen und Plasmide . . . . .	24
2.2.1 Nährmedien und Zusätze . . . . .	26
2.2.2 Anzucht und Haltung von Stammkulturen . . . . .	27
2.2.3 Selektion von Hefezellen . . . . .	28
2.3 Standardmethoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren . . . . .	28
2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion . . . . .	29
2.3.2 Alkoholpräzipitation . . . . .	29
2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung . . . . .	29
2.3.4 Agarosegelelektrophorese . . . . .	30
2.3.5 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten . . . . .	31
2.4 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren . . . . .	31

## *Inhaltsverzeichnis*

2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA . . . . .	31
2.4.2	Isolierung von mRNA . . . . .	32
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen . . . . .	33
2.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen . . . . .	35
2.4.5	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten . . . . .	35
2.5	Enzymatische Modifizierungen von Nukleinsäuren . . . . .	36
2.5.1	DNaseI-Verdau . . . . .	37
2.5.2	Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	37
2.5.3	Dephosphorylierung von DNA . . . . .	38
2.5.4	Ligieren von DNA-Fragmenten . . . . .	38
2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	40
2.6.1	PCR-Kolonie-'Screening' . . . . .	40
2.6.2	'Screening' von cDNA-Banken mit degenerierten Primern . . . . .	41
2.6.3	Verschachtelte ('nested') PCR . . . . .	42
2.7	Transfer von DNA . . . . .	43
2.7.1	Transformation von Bakterien . . . . .	43
2.7.2	Transformation von Hefen . . . . .	44
2.8	Konstruktion einer cDNA-Expressionsbibliothek . . . . .	46
2.8.1	Herstellung und enzymatische Bearbeitung doppelsträngiger cDNA . . . . .	46
2.8.2	Größenfraktionierung und Quantifizierung . . . . .	49
2.8.3	Ligation und Transformation . . . . .	50
2.8.4	Die Qualität der cDNA-Bibliothek . . . . .	51
2.9	Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek . . . . .	52
2.9.1	PCR-basiertes 'Screening' mit degenerierten Primern . . . . .	52
2.9.2	PCR-basiertes 'Screening' mit genspezifischen Primern . . . . .	53
2.9.3	Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde . . . . .	54
2.9.3.1	Herstellen und Testen der DIG-markierten Sonde . . . . .	55
2.9.3.2	Hybridisierung von Bakterienkolonien . . . . .	57
2.9.3.3	'Screening' der cDNA-Bibliothek mittels Hybridisierung . . . . .	61
2.9.4	Überprüfung der isolierten Klone . . . . .	62
2.10	Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR . . . . .	62
2.10.1	Amplifizierung der RACE-Produkte . . . . .	64

2.10.2	Isolierung und Klonierung der RACE-Produkte . . . . .	67
2.10.3	Sequenz- und Strukturanalyse von <i>CmCRE1</i> . . . . .	67
2.11	Funktionelle Expression von <i>CmCRE1</i> im Hefe-Komplementierungstest .	68
2.11.1	Klonierung von <i>CmCRE1</i> in den Hefektor p413TEF . . . . .	68
2.11.2	Transformation in den Hefestamm <i>sln1Δ</i> . . . . .	72
2.11.3	Charakterisierung von <i>CmCRE1</i> mit verschiedenen Pflanzenhormonen . . . . .	72
2.11.4	Sequenz- und Strukturanalyse der transformierten Hefeklonen . . .	72
2.12	Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR . . . . .	73
2.12.1	Herstellung der Standard-RNA . . . . .	74
2.12.2	Die Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion . . . . .	75
2.12.3	Überprüfung der RNA-Qualität . . . . .	77
2.12.4	Expressionsstudien in unterschiedlichen Geweben . . . . .	78
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>79</b>
3.1	Konstruktion einer cDNA-Expressionsbibliothek . . . . .	79
3.2	Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek . . .	81
3.2.1	PCR-basiertes 'Screening' mit degenerierten Primern . . . . .	81
3.2.2	PCR-basiertes 'Screening' mit genspezifischen Primern . . . . .	84
3.2.3	Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde . . . . .	86
3.2.4	Überprüfung der isolierten Klone . . . . .	87
3.3	Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR . . . . .	91
3.3.1	Amplifizierung der RACE-Produkte . . . . .	91
3.3.2	Isolierung und Klonierung der RACE-Produkte . . . . .	93
3.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse von <i>CmCRE1</i> . . . . .	94
3.4	Funktionelle Expression von <i>CmCRE1</i> im Hefe-Komplementierungstest .	95
3.4.1	Klonierung von <i>CmCRE1</i> in den Hefektor p413TEF . . . . .	96
3.4.2	Transformation in den Hefestamm <i>sln1Δ</i> . . . . .	97
3.4.3	Charakterisierung von <i>CmCRE1</i> mit verschiedenen Pflanzenhormonen . . . . .	99
3.4.4	Sequenz- und Strukturanalyse der transformierten Hefeklonen . . .	102
3.5	Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR . . . . .	104

<b>4 Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1 Konstruktion einer cDNA-Expressionsbibliothek . . . . .	108
4.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek . . .	108
4.3 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR . . . . .	110
4.4 Funktionelle Expression von <i>CmCRE1</i> im Hefe-Komplementierungstest .	113
4.5 Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR . . . . .	118
<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>Anhang</b>	<b>134</b>
A. Behandlung des Pflanzenmaterials . . . . .	135
B. PCR-Programme . . . . .	137
C. Primer . . . . .	137
D. Sequenz des Cytokininrezeptors <i>CmCRE1</i> . . . . .	139
E. Originalabbildungen der RT-PCR . . . . .	143
Die Expression von <i>CmCRE1</i> in sich entwickelnden Kürbiskeimlingen . . .	143
Die Expression von <i>CmCRE1</i> in Abhängigkeit exogen applizierter Cytokinine	145
Die lichtabhängige Expression von <i>CmCRE1</i> . . . . .	146
F. Herstellerverzeichnis . . . . .	148

# Abkürzungen

<b>ABA</b>	Abscisinsäure
<b>AGE</b>	Agarosegelelektrophorese
<b>AHK</b>	' <i>Arabidopsis</i> Histidin-Kinase'
<b>ARR</b>	' <i>Arabidopsis</i> Response Regulator'
<b>ASP (D)</b>	Aspartat
<b>At</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>BA</b>	Benzyladenin
<b>BCIP</b>	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-p-Toluidinsalz
<b>bidest</b>	bidestilliert
<b>bp</b>	'base pairs' (Basenpaare)
<b>BR</b>	24-Epibrassinolid
<b>cDNA</b>	'complementary DNA' ( zur mRNA komplementäre DNA)
<b>CHASE</b>	'cyclases/histidine-kinase-associated sensory extracellular (mutmaßliche Domäne für die Bindung von Hormonen mit geringer molekularer Masse)
<b>cfu</b>	'colony forming units' (Kolonie bildende Einheiten)
<b>CIAP</b>	'calf intestine alkaline phosphatase' (alkaline Phosphatase)
<b>CKI</b>	'cytokinin insensitive' (unempfindlich für Cytokinin)
<b>Cm</b>	<i>Cucurbita maxima</i>
<b>CmGA3ox1</b>	Gibberellin-3-Oxidase1 aus <i>Cucurbita maxima</i> (LANGE ET AL. 1997)
<b>CrCKR</b>	' <i>Catharanthus roseus</i> Cytokinin-Kinase-Rezeptor'
<b>CRE</b>	'cytokinin response' (auf Cytokinin reagierend)
<b>2,4-D</b>	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

## Abkürzungen

<b>deion</b>	deionisiert
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>dest</b>	destilliert
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	'deoxyribonucleic acid' (Desoxyribonukleinsäure)
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	2-Desoxy-Nukleosid-5-triphosphat
<b>ds</b>	'double strand' (doppelsträngig)
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b>EÄD</b>	empfängerähnliche Domäne
<b>E-Cup</b>	Eppendorf-Cup (Einweg-Reaktionsgefäß)
<b>ED</b>	Empfänger-Domäne
<b>EDTA</b>	Ethylendinitrilotetraessigsäure
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>EIN</b>	'ethylene insensitive' (unempfindlich für Ethylen)
<b>ERS</b>	'ethylene response sensor' (Ethylensensor)
<b>ETR</b>	'ethylene resistant' (immun gegenüber Ethylen)
<b>FP</b>	Forward Primer
<b>GA<sub>4</sub></b>	Gibberellin A <sub>4</sub>
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GAN</b>	'genebank accession number' (Zugangsnummer für Gendatenbanken)
<b>%GC</b>	GC-Gehalt eines DNA-Stranges in %
<b>Glc</b>	Glucose
<b>His (H)</b>	Histidin
<b>HK</b>	Histidin-Kinase
<b>IAA</b>	'3-indolacetic acid' (Indol-3-Essigsäure)
<b>IP</b>	Isopentenyladenin
<b>kbp</b>	'kilo base pairs' (Kilobasenpaare)
<b>2KR-Primer</b>	degenerierte Primer, die auf Sequenzen mit starker Ähnlichkeit zu Histidin-Kinasen aus 2-Komponenten regulatorischen Systemen beruhen
<b>LB</b>	Luria Bertani Medium



<b>Leu (L)</b>	Leucin
<b>M</b>	Molarität (mol/l)
<b>MCS</b>	'multi cloning site' (Klonierungsregion der Plasmid-Vektoren)
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>mRNA</b>	'messenger RNA' (Boten-Ribonukleinsäure)
<b>NBT</b>	Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ORF</b>	'open reading frame' (offener Leserahmen)
<b>PCR</b>	'polymerase chain reaction' (Polymerase-Ketten-Reaktion)
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>Raumt.</b>	Raumtemperatur
<b>RNA</b>	'ribonucleic acid' (Ribonukleinsäure)
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RP</b>	Reverse Primer
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>SDS</b>	'sodium dodecyl sulfate' (Natriumdodecylsulfat)
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEF</b>	'transcription elongation factor' (Promotorbezeichnung des He- fevektors p413TEF)
<b>TM</b>	Transmembran-Domäne
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
<b>Trp (W)</b>	Tryptophan
<b><i>t</i>-Zeatin</b>	<i>trans</i> -Zeatin
<b>U</b>	'unit' (Enzymeinheit)
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>Ura (U)</b>	Uracil
<b>UV/Vis</b>	'ultraviolet/visible' (ultraviolett und sichtbar)
<b>Vol.</b>	Volumen
<b>v/v</b>	'volume per volume' (Volumen pro Volumen)
<b>w/v</b>	'weight per volume' (Masse pro Volumen)
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid
<b>ZmHK1</b>	' <i>Zea mays</i> Histidin-Kinase'

## *Abkürzungen*

# 1 Einleitung

Höhere Pflanzen bestehen aus einer großen Anzahl spezialisierter Organe und Gewebe, welche zu einer funktionellen Einheit zusammengefügt sind. Zur Koordinierung der verschiedenen Teile des Organismus während der physiologischen Entwicklung sind zellübergreifende Regulationssysteme notwendig. Chemische Botenstoffe, die in Anlehnung an das tierische Hormonsystem Phytohormone genannt werden, spielen dabei eine große Rolle. Phytohormone werden unter dem Einfluss von Umweltreizen gebildet und setzen in den Zellen regulatorische Prozesse in Gang, welche zu einer Reaktion auf diesen Reiz führen. Es wird zwischen fünf klassischen Pflanzenhormongruppen unterschieden: Cytokinine, Auxine, Abscisinsäure, Gibberelline und Ethylen (KENDE U. ZEEVART 1997). Drei weitere Stoffklassen, denen erst seit relativ kurzer Zeit Phytohormonaktivitäten zugesprochen werden, sind Jasmonate, Brassinosteroide und Oligosaccharide (DAVIES 2004). Eine besonders wichtige Stellung für die pflanzliche Entwicklung kommt dabei den Cytokinen zu, da sie die Zellteilung – die Cytokinesis – fördern.

## 1.1 Die Funktion der Cytokinine in der pflanzlichen Entwicklung

Die Vermutung, dass die Mitoseaktivität pflanzlicher Meristeme durch endogene Faktoren reguliert wird, stammt bereits aus dem 19. Jahrhundert. Erfolgreich war die Suche nach zellteilungsfördernden Hormonen jedoch erst, als es gelang, aseptische Gewebekulturen herzustellen. Kinetin war die erste Substanz, die als Cytokinin identifiziert wurde, obwohl sie aus autoklavierter Heringssperma-DNA isoliert worden war (MILLER ET AL. 1955) und vermutlich in Pflanzen gar nicht natürlich vorkommt. Der erste Nachweis eines nativen pflanzlichen Cytokinins gelang 1963 durch die Isolierung von *trans*-Zeatin

## 1 Einleitung

aus Maiskaryopsen (LETHAM 1963). Seitdem sind verschiedene Cytokinine in diversen Pflanzenspezies identifiziert worden, wobei deutlich wurde, dass alle natürlich vorkommenden Cytokinine auf dem Purin Adenin basieren, an dessen N<sup>6</sup>-Ende eine Seitenkette substituiert vorliegt (MOK U. MOK 2001). Je nachdem, ob es sich um eine isoprenbasierte oder eine aromatische Seitenkette handelt, nennt man diese beiden Gruppen Isoprenoid-Cytokinine oder aromatische Cytokinine (Abbildung 1.1). Eine weitere, vermutlich rein künstliche Klasse von Cytokininin basiert auf einem Phenylurethan, auf die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

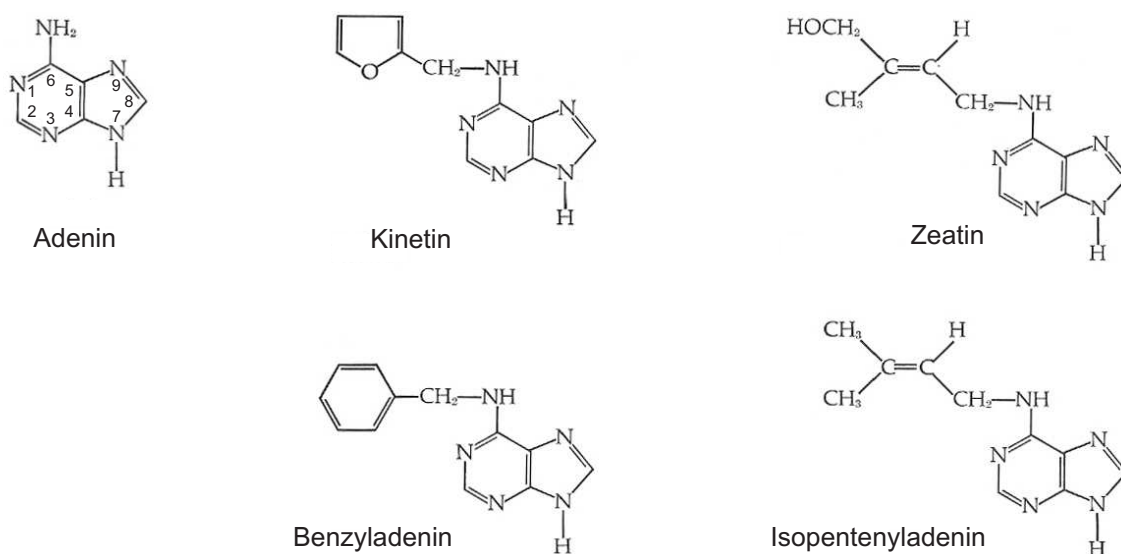


Abbildung 1.1: Strukturformeln von Adenin und der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten adeninbasierten Cytokinine.

Cytokinine lassen sich definieren als 'einen Oberbegriff für Substanzen, welche die Zellteilung fördern und andere wachstumsregulatorische Funktionen auf dieselbe Weise ausüben wie Kinetin' (SKOOG U. ARMSTRONG 1970). Damit ist die strukturelle Diversität abgedeckt, die Cytokinine abhängig von der Pflanzenart, ihrem Gewebe und Entwicklungsstatus an den Tag legen. Will man die Cytokinine aufgrund ihrer Struktur-Aktivitätsbeziehung klassifizieren, so bieten sich drei Gruppen an (SAKAKIBARA 2004). Die freie Basenform wird als hormonell aktiv angesehen, während die Riboside, also mit Ribose konjugierte Form, allgemein als inaktive Transportform betrachtet wird. Diese Transporttheorie wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Riboside relativ häufig im Xylem- und Phloemsaft unterschiedlicher Pflanzenspezies vorkommen. Verschiedene

### *1.1 Die Funktion der Cytokinine in der pflanzlichen Entwicklung*

Untersuchungen haben allerdings mittlerweile ergeben, dass sich eine Reihe von Cytokininrezeptoren in geringem Maße auch von einigen Ribosiden aktivieren lassen (SPICHAL ET AL. 2004, YONEKURA-SAKAKIBARA ET AL. 2004). Die dritte Gruppe bilden die Ribosid-5'-Phosphate, von denen bis jetzt nicht bekannt ist, ob sie ihre eigene spezifische Funktion besitzen oder nicht (SAKAKIBARA 2004). Die Biosynthese der Cytokinine findet in intakten Pflanzen zu einem Großteil in den Wurzeln und vor allem in dem meristematischen Gewebe der Wurzelspitzen statt, von wo aus sie in den Spross transportiert werden (LETHAM 1994). Durch kontrollierte Expression des Biosynthesenzyms Isopentenyltransferase und Pfropfungsexperimente sind auch Sprossmeristeme als Biosyntheseorte identifiziert worden (SCHMÜLLING 2002).

Die Wirkung der Cytokinine ist vielfältig untersucht und beschrieben worden, sowohl in Zellkulturen als auch in ganzen Pflanzen (MOK 1994). Die wohl wichtigste und eindrucksvollste Wirkung dieser Hormone besteht in der Induzierung der Zellteilung, was sich im Biotest nachweisen lässt (MILLER ET AL. 1956). In Kombination mit dem Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA) kommt es zum Wachstum und zur Differenzierung von Zellen eines Gewebestückes vom Tabakstengel. Dabei werden Zellteilung und Organbildung im Wesentlichen durch das Konzentrationsverhältnis der beiden Wuchsstoffe bestimmt (RAVEN ET AL. 1988). Die Rolle, die Cytokinine in der zugrundeliegenden Regulation des mitotischen Zellzyklus spielen, sind gegenwärtig jedoch erst ansatzweise erforscht (ROEF U. VAN ONCKELEN 2004). Cytokinine wirken außerdem der Apikaldominanz entgegen, wodurch sie in intakten Pflanzen das Austreiben von Seitenknospen aktivieren (NAPOLI ET AL. 1999). Weiterhin verzögern sie maßgeblich die Seneszenz und den damit verbundenen Chlorophyllabbau (RICHMOND U. LANG 1969, GAN U. AMASINO 1995). Die hier beschriebenen Effekte sind in Zellkulturen mittlerweile sehr gut definiert. In ganzen Pflanzen ist die Aktivität der Cytokinine dagegen oft durch die Interaktion mit anderen Hormonen maskiert (MOK U. MOK 2001) bzw. kann es durch die exogene Applikation von Cytokinin zu Effekten kommen, die normalerweise nicht unter ihrem Einfluss stehen (SCHMÜLLING, 2002). Diese Nebeneffekte können durch den Einsatz von Mutationslinien minimiert werden, in denen die Funktion bestimmter Gene der Cytokininbiosynthese oder -signaltransduktion verloren gegangen ist ('loss of function') oder überexprimiert wird (SCHEREZ ET AL. 1995, HWANG U. SHEEN 2001). Durch den veränderten Phänotyp lassen sich dann Rückschlüsse auf die Funk-

## 1 Einleitung

tion der Cytokinine in der Wildtyp-Pflanze ziehen. In Tabak wurden z.B. *CKX*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* exprimiert und damit der Cytokiningehalt beeinflusst. CKX (Cytokinin oxidase/dehydrogenase) ist ein Enzym, das einige Cytokinine und seine Riboside irreversibel deaktiviert. Dadurch konnte das Wachstumsverhalten von Pflanzen mit reduziertem Cytokiningehalt untersucht werden (WERNER ET AL. 2001). Neben typischen Cytokininwirkungen wurden hier auch unerwartete Effekte beobachtet. So führte der Cytokininmangel nicht, wie erwartet, zu einer verstärkten Apikaldominanz und auch nicht zu einer vorzeitigen Seneszenz. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Phytohormone nicht linear wirken, sondern vielmehr in einem komplexen Netzwerk aus Interaktionen mit anderen Hormonen und weiteren Einflüssen eingebunden sind. Für die Erkennung und Weiterleitung dieser Signale haben Pflanzen im Laufe ihrer Evolution viele verschiedene regulatorische Systeme entwickelt. Als wichtige Mechanismen haben sich in den letzten Jahren die Zwei-Komponenten regulatorischen Systeme herausgestellt, die ebenfalls an der Transduktion von cytokininvermittelten Signalen beteiligt sind.

## 1.2 Zwei-Komponenten regulatorische Systeme in Pflanzen

Im Jahr 1986 wurde zum ersten Mal der Begriff 'Zwei-Komponentensystem' für eine neue Klasse von regulatorischen Systemen in Bakterien geprägt (NINFA U. MAGASANIK 1986, NIXON ET AL. 1986). Das System besteht, wie der Name schon sagt, aus zwei Komponenten, die die vollständige Signaltransduktionskette bilden. Eine oftmals membranständige sensorische Histidin-Kinase bindet einen Liganden und fungiert somit als Rezeptor. Von ihr wird das Signal an einen sogenannten 'Response Regulator' weitergeleitet, ein cytosolisches Enzym, das aus einer Empfänger-Domäne und einer Effektor-Domäne besteht. Bei dieser Effektor-Domäne handelt es sich bei dem klassischen Zwei-Komponentensystem in den meisten Fällen um einen transkriptionellen Faktor, der direkt die Transkription des Zielgens im Genom reguliert. So sind von 32 bekannten 'Response Regulatoren' in *Escherichia coli* mindestens 25 als Transkriptionsfaktoren identifiziert (BROWN ET AL. 1993). Die Signalübertragung im Zwei-Komponentensystem beginnt mit der Bindung eines Liganden an der Sensordomäne der Histidin-Kinase (Abbildung

## 1.2 Zwei-Komponenten regulatorische Systeme in Pflanzen

1.2 A). Dadurch kommt es zu einer Autophosphorylierung eines Histidinrestes (H) in der Histidin-Kinase-Domäne. Histidin-Kinasen sind Dimere, so dass jeweils eine Untereinheit die andere unter Verwendung von ATP als Phosphatquelle phosphoryliert. Über den Transfer dieses Phosphatrestes auf einen Aspartatrest (D) in der Empfänger-Domäne des 'Response Regulators' wird das Signal weitergeleitet und der 'Response Regulator' auf diese Weise aktiviert. Die Deaktivierung erfolgt durch eine Dephosphorylierung des Aspartatrestes.

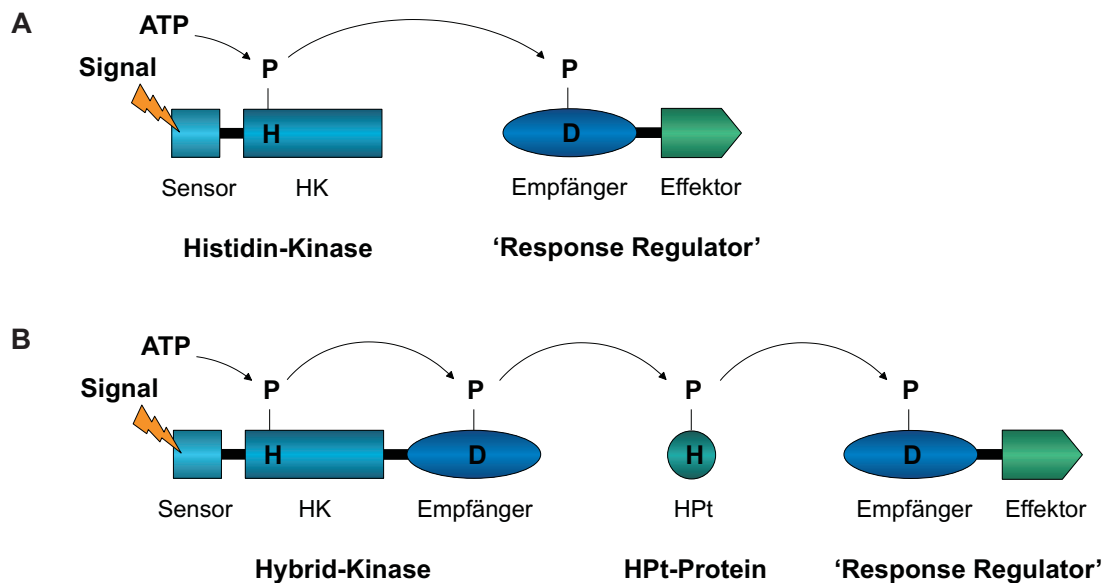


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des klassischen und des mehrschrittigen Zwei-Komponentensystems (nach LOHRMANN U. HARTER, 2002).

**(A)** Klassisches Zwei-Komponentensystem bestehend aus Histidin-Kinase und 'Response Regulator'. **(B)** Mehrschrittiges Zwei-Komponentensystem mit Hybrid-Kinase, Phosphotransferprotein (HPT-Protein) und 'Response Regulator'. Die Aktivierung und Signaltransduktion erfolgt durch die Übertragung eines Phosphatrestes (P) von der Histidin-Kinase-Domäne (HK) auf konservierte Histidin- und Aspartatreste (H und D) in den weiteren Domänen.

Gegenwärtig ist die Zahl der klassischen Zwei-Komponentensysteme auf einige hundert in Eubakterien und Archaeen angewachsen, kommt aber nur selten in einigen wenigen eukaryotischen Organismen vor (STOCK ET AL. 2000). In den Eukaryonten findet man häufiger eine etwas komplexere Variante mit zusätzlichen Elementen, die allgemein als mehrschrittiges Zwei-Komponentensystem bezeichnet wird (Abbildung 1.2 B). Hier sind

## 1 Einleitung

weitere zusätzliche Komponenten mit phosphorylierbaren Histidin- oder Aspartatreten integriert. So ist die Histidin-Kinase oft mit einer Empfänger-Domäne fusioniert, die einen phosphorylierbaren Aspartatrest besitzt, und wird auf diese Weise zu einer Hybrid-Histidin-Kinase erweitert. Ein weiterer phosphorylierbarer Histidinrest befindet sich in einem Phosphotransferprotein (HPT-Protein), das als Überträger des Phosphatrestes von der Hybrid-Kinase zum 'Response Regulator' dient. Die 'Response Regulatoren' können ebenfalls als Transkriptionsfaktoren fungieren, wie es für die Typ-B 'Response Regulatoren' in *A. thaliana* (Typ-B ARR) propagiert wird (HOSODA ET AL. 2002). Häufig treten sie aber auch als Regulator für MAP-Kinasekaskaden auf, wie z.B. im Fall des Osmosensors SLN1-YPD1-SSK1 in *Saccharomyces cerevisiae* (POSAS ET AL. 1996; Abbildung 1.6).

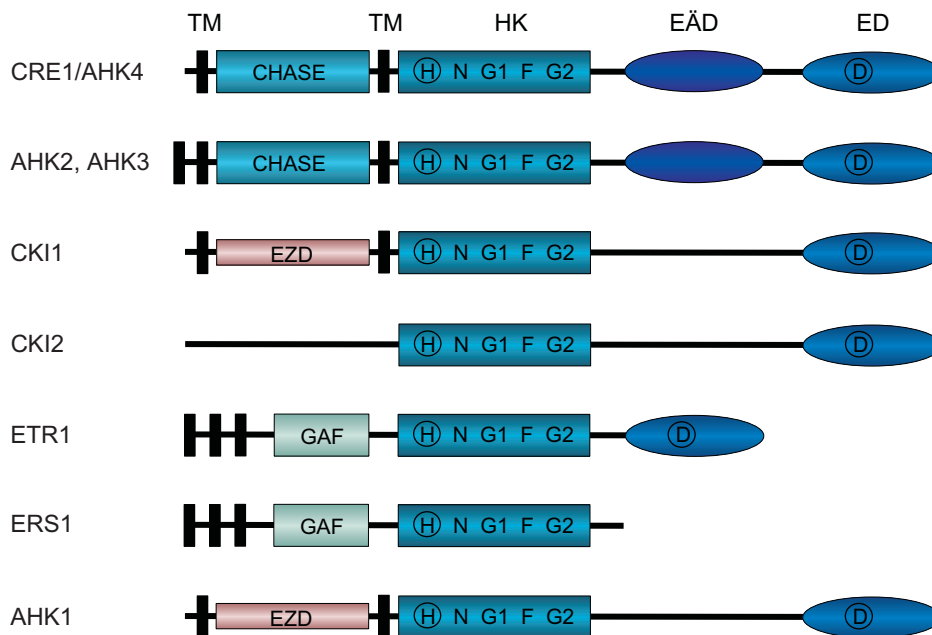


Abbildung 1.3: Strukturelemente der Histidin- und Hybrid-Kinasen in *A. thaliana*.

**TM**: Transmembran-Domäne; **HK**: Histidin-Kinase-Domäne; **EÄD**: empfängerähnliche Domäne; **ED**: Empfänger-Domäne; **CHASE**: cyclases/histidine-kinase-associated sensory extracellular (mutmaßliche Domäne für die Bindung von Hormonen mit geringer molekularer Masse – ANANTHARAMAN U. ARAVIND, 2001); **EZD**: extrazelluläre Domäne; **GAF**: GAF-Domäne (benannt nach seinem Vorkommen in der cGMP-regulierten Phosphodiesterase und Adenylat-Cyclase in *Anabaena* und dem bakteriellen Transkriptionsfaktor FhIA); **H, N, G1, F, G2**: stark konservierte Boxen in der Histidin-Kinase-Domäne. Die phosphorylierbaren Aminosäuren sind eingekreist.



## 1.2 Zwei-Komponenten regulatorische Systeme in Pflanzen

Anfang der neunziger Jahre wurden mit dem Ethylenrezeptor ETR1 in *A. thaliana* (CHANG ET AL. 1993) und dem Osmosensor SLN1 in *S. cerevisiae* (MAEDA ET AL. 1994) die ersten Hybrid-Kinasen in Eukaryonten entdeckt. Mittlerweile ist bekannt, dass sich die Verbreitung der Zwei-Komponentensysteme über die Reiche der Eubakterien, Archaeen, Pflanzen und Pilze erstreckt. Lediglich in tierischen Genomen sind keine homologen Proteine bekannt, selbst nicht in den Spezies *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens*, deren Genome mittlerweile vollständig durchsequenziert wurden (KAKIMOTO 2003). Im Bereich der Höheren Pflanzen gibt es mehrere Spezies, in denen das Zwei-Komponentensystem erforscht wird, am detailliertesten jedoch in *A. thaliana*. Die vollständige Sequenzierung dessen Genoms enthüllte acht Histidin- bzw. Hybrid-Kinasen (AHKs), fünf Phosphotransferproteine (AHPs) und 23 'Response Regulatoren' (ARRs) (GREFEN U. HARTE 2004). Die AHKs lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Funktion mehreren Familien zuordnen. AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 gelten als Cytokininrezeptoren (MÄHÖNEN ET AL. 2001, INOUE ET AL. 2001, SUZUKI ET AL. 2001A, YAMADA ET AL. 2001) und ETR1 und ERS1 sind Ethylenrezeptoren (CHANG ET AL. 1993, HUA ET AL. 1995). ERS1 stellt bis jetzt die einzige bekannte pflanzliche Histidin-Kinase dar, die nicht dem oben vorgestellten Hybrid-Typ entspricht (Abbildung 1.3). AHK1 wird allgemein als Osmosensor angesehen, da eine relativ hohe Homologie zu dem Hefe-Osmosensor SLN1 besteht und AHK1 in der Lage ist, SLN1 in Hefezellen zu ersetzen (URAO ET AL. 1999). Allerdings lässt sich auch die Aktivität von CRE1/AHK4 im Hefe-Komplementierungstest in Gegenwart von Cytokinin durch Änderungen im Turgordruck regulieren (REISER ET AL. 2003). Eine gesicherte Aussage zur Funktion von AHK1 steht demnach noch aus. Des Weiteren gibt es noch zwei Hybrid-Kinasen mit unklarer molekularer Funktion (CKI1 und CKI2). Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, dass CKI1 und CKI2 direkt an der Cytokinin-Signaltransduktion beteiligt sind. Beide Gene resultierten aber, als sie überexprimiert wurden, in einem cytokininunabhängigen Kalluswachstum (KAKIMOTO 1996, 2003). CKI2 hat als einzige der Histidin-Kinasen keine Transmembran-Domänen und nimmt aufgrund dessen als vermeintlich cytosolisches Protein eine Sonderstellung ein. Alle Histidin-Kinasen enthalten jedoch fünf hochkonservierte Blöcke in der Sequenz der Histidin-Kinase-Domäne (H mit dem phosphorylierbaren Histidinrest, N, G1, F, G2), welche für die Histidin-Kinaseaktivität unbedingt notwendig sind (WEST U. STOCK,

## 1 Einleitung

2001). Diese Blöcke fehlen z.B. einer weiteren Klasse von Ethylenrezeptoren (ETR2, EIN4 und ERS2; BLEECKER U. KENDE, 2000), was sie aus der Klasse der Histidin-Kinasen ausschließt, obwohl sie ansonsten ETR1 und ERS1 sehr ähnlich sind.

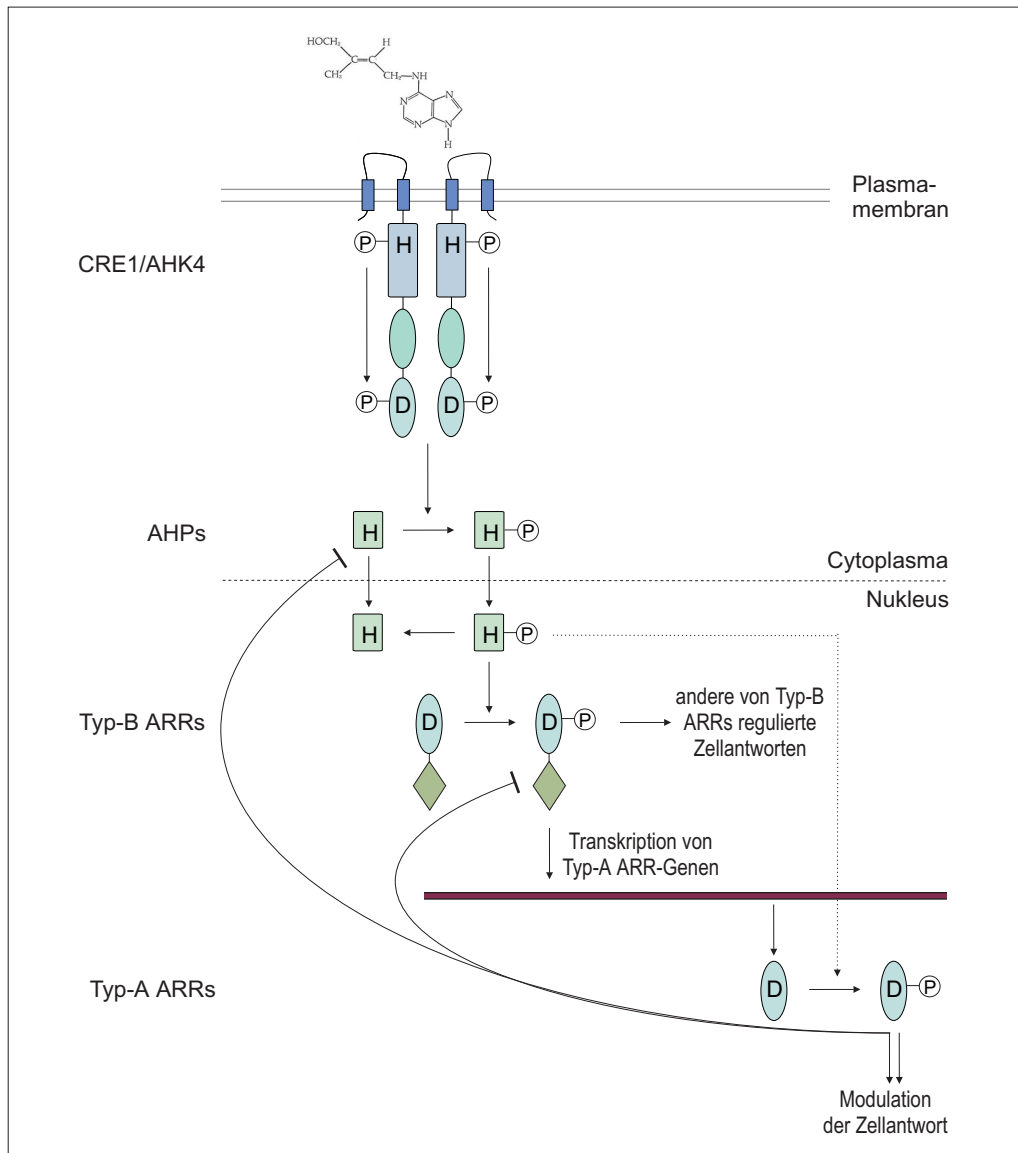


Abbildung 1.4: Modell der Cytokinin-Signaltransduktion in *A. thaliana* (nach HEYL U. SCHMÜLLING, 2003).

**CRE1/AHK4:** *Arabidopsis* Histidin-Kinase; **AHPs:** *Arabidopsis* Histidin-Transferprotein; **ARRs:** *Arabidopsis* 'Response Regulator'; **H:** Histidinrest; **D:** Aspartatrest; **P:** Phosphatrest.

## 1.2 Zwei-Komponenten regulatorische Systeme in Pflanzen

Die *Arabidopsis*-HPT-Proteine (AHP1 bis AHP5) fungieren vermutlich, wie bereits in Abbildung 1.2 dargestellt, als Phosphotransferproteine zwischen den AHKs und den 'Response Regulatoren'. Diese Vermutung wurde durch Interaktionen einiger AHPs mit ARR1 im 'Yeast two-hybrid'-Test bestätigt (SUZUKI ET AL. 2001B). Außerdem konnte zumindest für AHP1 und AHP2 eine cytokininabhängige Translokation vom Cytoplasma in den Nukleus nachgewiesen werden (HWANG U. SHEEN 2001). Das dritte Element des Zwei-Komponentensystems in *A. thaliana* stellen die 23 'Response Regulatoren' dar, die sich aufgrund ihrer Struktur in Typ-A und Typ-B ARRs unterteilen lassen. Daneben sind auch noch weitere neun 'Pseudo Response Regulatoren' bekannt (URAO ET AL. 2000), auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wird. Typ-A ARRs bestehen im Wesentlichen aus einer Empfänger-Domäne mit kurzen Verlängerungen an den N- und C-terminalen Enden. Die Expression lässt sich durch Cytokinin induzieren und erfüllt alle Kriterien eines sogenannten 'primary response gene', welches auf einen Reiz unmittelbar mit einer Expressionsänderung reagiert (D'AGOSTINO ET AL. 2000). Die Transkriptgehalte der Typ-B ARRs dagegen werden durch Cytokinin nicht beeinflusst (HEYL U. SCHMÜLLING, 2003). Sie enthalten neben der Empfänger-Domäne noch eine C-terminale Effektor-Domäne mit einer Struktur, die mit bekannten DNA-Bindemotiven verwandt ist. Daher geht man im Allgemeinen davon aus, dass die Typ-B ARRs als Transkriptionsfaktoren agieren. Zusätzlich wurde ihre Lokalisation im Nukleus sowie transkriptionelle Aktivität nachgewiesen (LOHRMANN U. HARTER, 2002). Die am besten analysierten Zielobjekte der Typ-B ARRs sind die Gene der Typ-A ARRs. Untersuchungen mit *A. thaliana*-Mutationslinien, in denen einzelne oder mehrere Typ-A *arr*-Allele entweder die Funktion verloren haben ('loss-of-function alleles'), oder überexprimiert wurden, zeigten, dass die Typ-A ARRs Cytokinineffekte negativ regulieren (GREFEN U. HARTER 2004). Vermutlich agieren Typ-A ARRs nicht als eigentlicher Teil des Cytokinin-Signalweges, sondern modulieren eher die zelluläre Reaktion und erhalten die Cytokinin-Homöostase (Abbildung 1.4).

Neben Cytokinin scheinen noch weitere Faktoren Zugriff auf den 'Pool' der AHPs und ARRs in *A. thaliana* zu haben. Cytokinin stimuliert die Zellteilung, wohingegen Ethylen Reifung und Seneszenz fördert, indem beide Hormone vermutlich die AHPs und ARRs in einer gegensätzlichen Weise kontrollieren (OKA ET AL. 2002). Auch die Transduktion von Lichtsignalen scheint neben Cytokinin und Ethylen ebenfalls an diesem Netz-

## 1 Einleitung

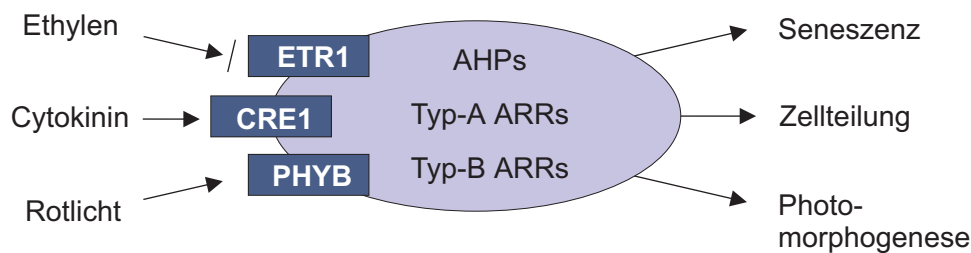


Abbildung 1.5: Die Signaltransduktionsketten von Cytokinin, Ethylen und Rotlicht in *A. thaliana* werden durch denselben 'Pool' von Phosphotransferproteinen (AHPs) und 'Response Regulatoren' (ARRs) geleitet und interagieren so miteinander (nach OKA ET AL. 2002).

werk zu partizipieren (Abbildung 1.5). Fünf Phytochrome (PHYA bis PHYE), die als Serin-/Threonin-Kinasen fungieren, erkennen rotes Licht (SCHNEIDER-POETSCH ET AL. 1991). Es ist bekannt, dass der cytokinininduzierte Typ-A 'Response Regulator' ARR4 lichtabhängig akkumuliert und mit dem N-Terminus von PHYB interagiert, was in einer Stabilisierung der physiologisch aktiven Form von PHYB resultiert (SWEERE ET AL. 2001). Das zeigt, dass die Zwei-Komponentensysteme in Höheren Pflanzen ein komplexes Netzwerk bilden, in dem verschiedene Signaltransduktionssysteme miteinander interagieren. Die einzelnen Elemente des Zwei-Komponentensystems in Pflanzen unterscheiden sich nicht sehr von denen in Prokaryonten. Dennoch zeigen die Zwei-Komponentensysteme in Pflanzen die notwendige Komplexität, um die große Vielfalt adaptiver Reaktionen zu gewährleisten, die für die physiologische Entwicklung der Organismen notwendig sind.

### 1.3 Der Hefe-Komplementierungstest als Beweis für die Rezeptortätigkeit

Der Beweis für die Rezeptortätigkeit einer Histidin-Kinase ist in der intakten Pflanze schwer zu erbringen, da Interaktionen in dem komplexen Netzwerk der verschiedenen Signaltransduktionswege zu mißverständlichen Resultaten führen können. So wurde CK11 als Kandidat für einen Cytokininrezeptor gehandelt, da seine Überexpression in Pflanzen unabhängig von Cytokinin typische Cytokininreaktionen auslöste (KAKIMOTO 1996,

### 1.3 Der Hefe-Komplementierungstest als Beweis für die Rezeptortätigkeit

HWANG U. SHEEN 2001). Allerdings gibt es keine weiteren Daten, die eine Rezeptorfunktion bestätigen, so dass der Grund für eine Cytokininantwort auch einfach in einem unerwarteten Zusammenspiel zwischen CKI1 und dem Cytokinin-Signalweg liegen kann. Ein weiterer Kandidat, der als Cytokininrezeptor in Frage kam, war die Hybrid-Kinase CRE1/AHK4, die für den Beweis ihrer Funktion aus dem pflanzlichen Kontext herausgelöst und isoliert betrachtet wurde. Für die Untersuchung wurde ein Test eingesetzt, in dem CRE1/AHK4 eine *S. cerevisiae*-Mutante komplementierte, der selbst

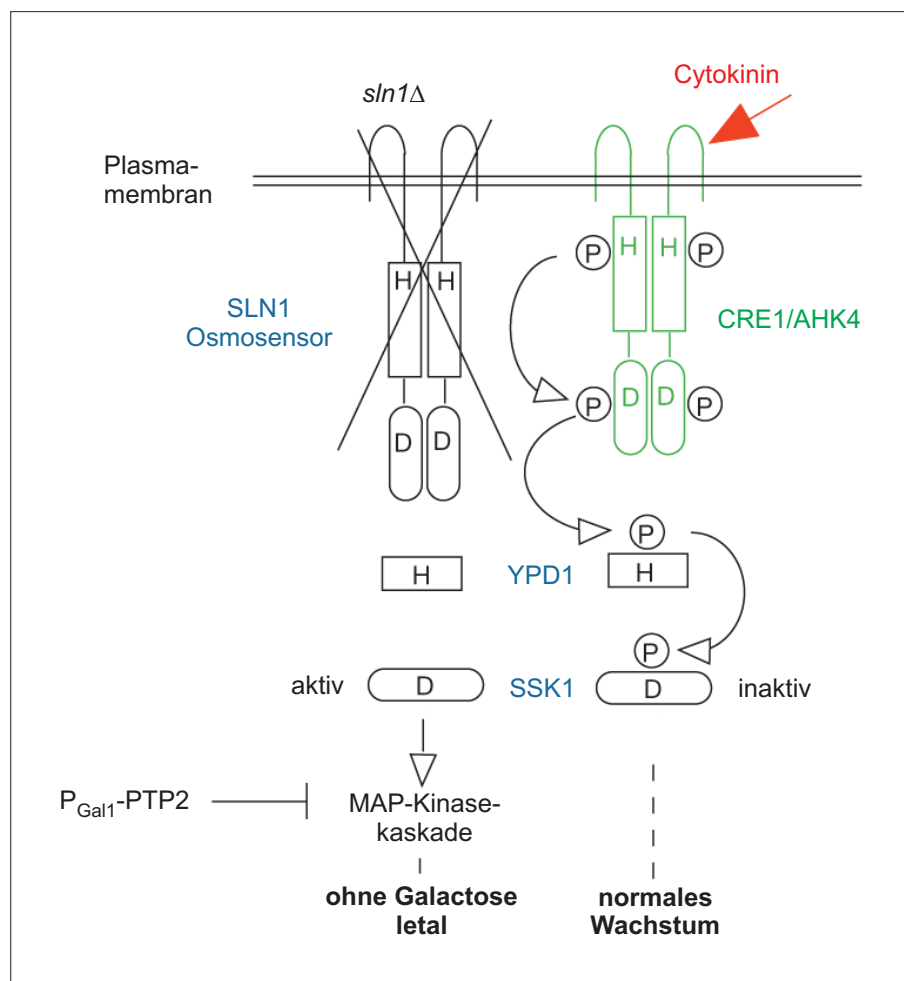


Abbildung 1.6: Substitution des defekten Osmosensors SLN1 durch CRE1/AHK4 im Hefe-Komplementierungstest (nach INOUE ET AL. 2001).

*sln1Δ* ist letal, da der dephosphorylierte 'Response Regulator' SSK1 kontinuierlich die Map-Kinasekaskade aktiviert. Durch das Cytokinin als Liganden wird CRE1/AHK4 aktiviert, der Phosphotransfer inaktiviert SSK1 und die Letalität der Hefemutante *sln1Δ* wird unterdrückt.

## 1 Einleitung

eine Hybrid-Kinase fehlte. Diese Hefemutante *sln1Δ* ist defizient in dem *SLN1*-Gen, welches für einen Osmosensor in einem Zwei-Komponentensystem codiert (MAEDA ET AL. 1994). Die normale Funktion des Osmosensors sieht so aus, dass die Histidin-Kinase von SLN1 bei normaler Osmolarität aktiv ist und über das Phosphotransferprotein YPD1 den 'Response Regulator' SSK1 phosphoryliert. Das phosphorylierte SSK1 inhibiert eine MAP-Kinasekaskade, ein weit verbreitetes Element der Signaltransduktion in eukaryotischen Organismen, das ebenfalls auf einer Kette von Phosphorylierungen basiert. In der Mutante *sln1Δ* wird SLN1 nicht funktionell exprimiert, was zu einer Ansammlung nichtphosphorylierten 'Response Regulators' führt (Abbildung 1.6). Dieser aktiviert konstitutiv die MAP-Kinasekaskade, in der einzelne Komponenten toxisch auf die Hefezelle wirken. Daher ist *sln1Δ* bei normaler Osmolarität letal. Die Letalität kann durch Galactose im Medium aufgehoben werden, da ein modifiziertes PTP2-Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Gal1-Promotors in die Mutante eingebracht wurde. In der Anwesenheit von Galactose hemmt PTP2 die MAP-Kinasekaskade und die Zelle vermehrt sich. CRE1/AHK4 ersetzte erfolgreich SLN1 und die Mutante wuchs auf Glucosemedium in der Gegenwart von *t*-Zeatin (INOUE ET AL. 2001). War kein *t*-Zeatin im Medium enthalten, starb die transformierte Zelle, selbst wenn sie *CRE1/AHK4* erfolgreich exprimierte. Erst die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden setzt die Signaltransduktion in Gang.

Im Verlauf der vergangenen Jahre haben Histidin-Kinasen als Rezeptoren für Pflanzenhormone zunehmend an Bedeutung gewonnen. Aber nur in *A. thaliana* wurden sie und alle weiteren Elemente der Zwei-Komponentensysteme mittlerweile identifiziert. Darüber hinaus ist dieser Rezeptortyp nur in wenigen Pflanzenspezies eingehender untersucht und charakterisiert worden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung, Isolierung und der funktionellen Expression einer Histidin-Kinase aus Kürbis (*Cucurbita maxima*), einer Pflanzenart, in der bis jetzt noch keine Untersuchungen zu ihrer Existenz durchgeführt wurden. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen dazu beitragen, weitere Spezies in die Erforschung der Zwei-Komponentensysteme einzubeziehen und diese damit auf eine breitere Basis zu stellen.

## 2 Material und Methoden

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Isolierung und funktionelle Expression von Histidin-Kinasen aus Kürbis, die als Rezeptoren in Zwei-Komponenten regulatorischen Systemen fungieren könnten. Am Anfang wurde dieses Ziel undifferenziert mit unterschiedlichen degenerierten Primern verfolgt, die auf den Alignments mehrerer Histidin-Kinasen basierten. In den Abschnitten 2.8 und 2.9 wird beschrieben, wie für diese Zwecke eine cDNA-Expressionsbibliothek entwickelt und mit den degenerierten Primern durchsucht wurde. Da sich diese Methode jedoch im Verlauf der Arbeit als ineffizient herausstellte, wurde die Aufmerksamkeit auf ein spezifisches Gen konzentriert. Für die Isolierung von *CmCRE1*, einem Homologon zu *CRE1/AHK4* aus *A. thaliana* wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt, PCR-basiertes 'Screening' und Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde (Abschnitt 2.9). Die Identifizierung des fehlenden 5'-Endes des Gens schließlich wird in Abschnitt 2.10 erklärt. Im zweiten Teil der Arbeit stand die Charakterisierung des Gens *CmCRE1* im Vordergrund, die sich in zwei verschiedene Bereiche gliederte. Zum einen wurde das vollständige Gen in den Hefestamm *sln1Δ* kloniert und im Hefe-Komplementierungstest funktionell exprimiert (Abschnitt 2.11). Zum Anderen erfolgten detaillierte Expressionsstudien mittels quantitativer RT-PCR (Abschnitt 2.12).

### 2.1 Anzucht von Pflanzenmaterial

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial und Klimakammern

Für sämtliche Nukleinsäure-Präparationen wurde *Cucurbita maxima* L. var. 'Riesenmelone, gelb genet' benutzt (Samenhaus Knieke). Die Pflanzen wurden in zwei identischen Klimakammern mit einer Grundfläche von 2,3m<sup>2</sup> und 2m Höhe unter unterschiedlichen Licht- und Temperaturverhältnissen angezogen (Tabelle 2.1). Zur Beleuchtung wurden

## 2 Material und Methoden

zwei Lampen eingesetzt (Powerstar HQI-T 400W/D Daylight von Osram;  $190\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), die in 80cm Abstand zu den Pflanzen positioniert waren. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Anzuchten und Ernten stehen in Anhang A.

Tabelle 2.1: Umweltbedingungen der verwendeten Klimakammern

	<b>Klimakammer I</b> (Langtagbedingungen)		<b>Klimakammer II</b> (Etiolement)
	Lichtphase	Dunkelphase	Dunkelphase
Dauer	16h	8h	24h
Temperatur	25°C	18°C	18°C
Luftfeuchte	65 – 95%	65 – 95%	65 – 95%

### 2.1.2 Pflanzgranulat, Nährlösungen, Wuchs- und Hemmstoffe

Die Anzucht der Samen erfolgte in mit Vermiculite (natürlicher Dämmstoff, Dämmstoffe GmbH) gefüllten Pflanzschalen. Gegossen wurde je nach experimentellen Anforderungen mit Leitungswasser oder Spinatnährlösung (NL).

Tabelle 2.2: Verwendete Wuchs- und Hemmstoffe

Hormonklasse	Bezeichnung	Molekulargewicht	Lösungsmittel
Gibberellin	GA <sub>4</sub>	332,4	MeOH
Cytokinin	<i>trans</i> -Zeatin	219,2	NaOH
	IP (Isopentenyladenin)	203,2	NaOH
	Kinetin	215,2	NaOH
	BA (Benzyladenin)	225,2	NaOH
Brassinosteroid	BR (24-Epibrassinolid)	480,7	MeOH
Abscisisäure	ABA	264,3	MeOH
Auxin	IAA (Indol-3-Essigsäure)	175,2	MeOH

Wuchs- und Hemmstoffe wurden in methanolischen Stammlösungen mit der Konzentration  $10^{-2}\text{M}$  oder in 0,05N NaOH mit der Konzentration  $10^{-3}\text{M}$  bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert (Tabelle 2.2). Der Nährlösung wurden sie in einer Endkonzentration von  $10^{-6}\text{M}$  zugegeben. Die



maximale Methanolmenge war kleiner als 0,1% (v/v) und der pH-Wert lag in einem Bereich zwischen 7,0 und 7,5.

### **Spinatnährlösung:**

(für 10l in Leitungswasser)

KNO <sub>3</sub> (1M)	30ml
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (1M)	20ml
MgCl <sub>2</sub> (1M)	20ml
MgSO <sub>4</sub> (1M)	10ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,5M),	
pH 7,2 (KOH)	6ml
Spurenelemente	6ml
NaFe-EDTA	6ml

### **Spurenelemente:**

(für 1l)

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,68g
MnCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,20g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,029g

### **NaFe-EDTA:**

(für 1l)

FeCl <sub>3</sub>	21,6g
Na <sub>2</sub> EDTA	17,0g

### 2.1.3 Behandlung des Pflanzenmaterials

Die Samen wurden nach äußerlichen Anzeichen für ihre Keimfähigkeit handverlesen und gemäß ihren späteren Wachstumsbedingungen bei Tageslicht oder in Dunkelheit zum Quellen gebracht. Die Quelldauer betrug 3 bis 4h in dem jeweils für die Anzucht vorgesehenen Nährmedium inklusive Wuchs- oder Hemmstoffen. Vor dem Einsetzen der gequollenen Samen wurde das Vermiculite mit Wasser durchfeuchtet. Es wurde täglich mit 10ml der mit Wuchs- oder Hemmstoffen versetzten Nährlösung (Raumt.) pro Keimling gegossen. Bei einem erhöhten Flüssigkeitsbedarf wurde zusätzlich mit unbehandelter Nährlösung gegossen.

Für die Ernte wurden die Keimlinge von Vermiculiteresten befreit und nach Pflanzenteilen sortiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dabei wurde entweder zwischen Spross und Wurzel unterschieden oder die Pflanzen für detailliertere Untersuchungen in Apikalspitze (mit Folgeblättern), Kotyledonen, Hypokotyl, Wurzelrest und Wurzelspitze unterteilt. Offensichtlich missgebildete Keimlinge wurden vor der Ernte aussortiert. Zur

## 2 Material und Methoden

Isolierung von Nukleinsäuren wurde das Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben. Das gefrorene Pulver wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder in Greiner-Röhrchen bei -70°C gelagert.

## 2.2 Bakterienstämme, Hefen und Plasmide

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme von *S. cerevisiae* und *E. coli* sowie unterschiedliche Plasmide verwendet (Tabellen 2.3, 2.4 und 2.5). In Tabelle 2.6 sind die im Zuge dieser Arbeit entwickelten Hybridplasmide aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendeter *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

Stamm	relevanter Phäno <sup>1)</sup> - bzw. Genotyp	Referenz
<i>S. cerevisiae</i> <i>sln1</i> Δ (TM182)	Phänotyp: leu2, his3, sln1 Genotyp: ura3, leu2, his3, sln1::hisG + pSSP25 (pSSP25 = PGAL1:PTP2, URA3, ADE3, 2micron)	MAEDA ET AL. 1994

Tabelle 2.4: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	relevanter Phäno <sup>2)</sup> - bzw. Genotyp	Referenz
XI10-Gold	Tet <sup>R</sup> , Δ( <i>mcrA</i> )183, Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac Hte</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lac<sup>R</sup></i> , ZΔ <i>M15</i> , Tn10(Tet <sup>R</sup> ), Amy Cam <sup>R</sup> ]	Stratagene
TOP10	F- <i>mcrA</i> , Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), Φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

<sup>1)</sup> auxotroph für die Aminosäuren Leucin und Histidin

<sup>2)</sup> + bzw. - = Eigenschaften vorhanden bzw. fehlend; <sup>R</sup> = natürliche Resistenz gegenüber Tet (Tetracyclin), Cam (Chloramphenicol), Str (Streptomycin)

Tabelle 2.5: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevanter Phäno <sup>3)</sup> - bzw. Genotyp	Größe [kbp]	Referenz
pUC18	<i>lacPOZ'</i> , Ap <sup>r</sup>	2,69	HANNA ET AL. 1984
pBluescript SK +/-	<i>LacZ</i> , Ap <sup>r</sup>	2,96	Stratagene
p413TEF	Ap <sup>r</sup> , His3	5,60	MUMBERG ET AL. 1995
pCR2.1-TOPO	<i>LacZα</i> , Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	3,93	Invitrogen

Tabelle 2.6: Konstruierte Hybridplasmide (Referenz: diese Arbeit)

Konstruktbezeichnung (Herkunft)	DNA-Fragment (Größe)	kloniert mit	Vektor
<b>Klon 4</b> (PCR-Fragment)	621bp-Fragment von CmCRE1	TA Cloning <sup>4)</sup>	pCR2.1-TOPO
<b>Klon H1</b> (cDNA-Bank, Hybridisierung)	3'-Ende von CmCRE1 (2 072bp)	XbaI/EcoRI	pB-SK(+)
<b>Klon 276</b> (cDNA-Bank, PCR-'Screening')	identisch zu Klon H1 (2 072bp)	XbaI/EcoRI	pB-SK(+)
<b>Klon 3</b> (5'RLM-RACE)	5'-Ende von CmCRE1 (2 211bp)	TA Cloning	pCR2.1-TOPO
<b>Klon 11</b> (5'RLM-RACE)	5'-Ende von CmCRE1 mit 137bp Intron (2 359bp)	TA Cloning	pCR2.1-TOPO
<b>CmCRE1-1 bis -7</b> (Hefe-Klone)	CmCRE1 (3 053bp, funktionell aktiv)	XbaI/XhoI	p413TEF
<b>RT9</b> (RT-Standard)	Klon 276 mit 503bp-Insert (aus CmGA3ox1)	XbaI/EcoRI	pB-SK(+)

<sup>3)</sup>r = Resistenz gegenüber Ap (Ampicillin), Kan (Kanamycin); Genotypbezeichnung s. Referenz

<sup>4)</sup>TOPO TA Cloning Kit – Invitrogen, Karlsruhe

### 2.2.1 Nährmedien und Zusätze

Für die Zellanzucht wurden die nachfolgend aufgeführten Nährmedien verwendet<sup>5)</sup>. Alle Medien wurden direkt nach dem Ansetzen 20min bei 120°C autoklaviert. Die Zugabe von hitzeempfindlichen Zusätzen erfolgte nach Abkühlung auf ca. 50°C.

#### Medien für die Anzucht von Bakterien

##### (LB) Luria Bertani Medium:

Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	10g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000ml
pH 7,5 (NaOH)	

Für die Herstellung von Platten wurde fertiger LB-Agar verwendet (Sigma), der je nach Bedarf nach dem Autoklavieren mit 1,5ml Carbenicillin (Stammlösung: 50mg/ml) pro Liter Medium versetzt wurde. Die Carbenicillin-Stammlösung wurde nach SAMBROOK U. RUSSEL (2001) mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

##### X-Gal-Platten:

LB-Agar	1000ml
Nach dem Autoklavieren:	
Carbenicillin (50mg/ml)	1,5ml
IPTG (1M Lösung; in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> )	1ml
X-Gal (2%ig (w/v); in N,N-Dimethylformamid)	2ml

#### Medien für die Anzucht von Hefen

##### Hefe-Pepton-Galactose (YP-Gal)-Komplettmedium:

Hefeextrakt	10g
Pepton	20g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 900ml
Nach dem Autoklavieren:	
20% Galactose	100ml

---

<sup>5)</sup>Medien für Bakterien nach SAMBROOK U. RUSSEL (2001), Hefemedien nach AUSUBEL ET AL. (1999)

Für die Anzucht von kompetenten Zellen wurde YPA-Gal-Flüssigmedium verwendet, welches neben den oben aufgeführten Inhaltsstoffen für YP-Gal auch noch 18mg Adenin-Hemisulfat enthielt.

### **Complete Minimal (CM)-Dropout-Medium:**

'Yeast Nitrogen Base'	1,7g
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 800ml

Nach dem Autoklavieren:

20% Galactose oder Glucose	100ml
10x 'Dropout-Solution' ohne die selektiven Aminosäuren	100ml
Hormonlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen	

Feste Medien enthielten zusätzlich 2% (w/v) Agar (Difco) und 0,01% (w/v) NaOH-Plättchen. Die 10x 'Dropout-Solution' war eine zehnfach konzentrierte Aminosäurelösung, der nur diejenigen Aminosäuren fehlten, nach denen selektiert wurde (AUSUBEL ET AL. 1999). Die Hormone wurden in einer Endkonzentration von 10<sup>-8</sup>M bis 10<sup>-4</sup>M direkt vor dem Gießen der Platten in das CM-Minimalmedium gemischt.

### **2.2.2 Anzucht und Haltung von Stammkulturen**

Die Anzucht in Flüssigmedien erfolgte in der Regel in Erlenmeyerkolben, die zu einem Fünftel ihres Volumens mit Nährmedium gefüllt waren. Übernachtskulturen von 10ml Volumen wurden jedoch immer in 50ml-Greiner-Röhrchen angezogen. Die Kulturen wurden in einem Schüttelwasserbad (Schütt) bei 30°C (Hefen) bzw. 37°C (Bakterien) und 250 Umdrehungen pro Minute (U/min) bewegt und der Wachstumsverlauf über die Veränderung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Spektralphotometer (Genesys10uv scanning, ThermoSpectronic) in Einwegküvetten mit einer Schichtdicke von 1cm gegen das Medium.

Die Lagerung der Bakterien und Hefestämme ist kurzfristig (bis zu drei Wochen) auf geeigneten Agarplatten bei 4°C möglich. Eine langfristige Konservierung erfolgte als Glycerin-Suspension bei -70°C. Zu diesem Zweck wurden im Falle von *E. coli* 830µl einer ausgewachsenen LB-Flüssigkultur mit ca. 170µl 87%igem Glycerin (w/v) in einem 1,5ml-E-Cup vermischt. Hefekolonien wuchsen bis zu ihrer log-Phase (OD<sub>600</sub> = 0,8 – 1,0) und wurden dann gleichermaßen mit Glycerin vermischt.

### 2.2.3 Selektion von Hefezellen

Der Hefestamm *sln1Δ* neigt sehr stark zur Bildung von Revertanten, d.h. zur Rückmutation in den Wildtyp. Daher wurden Zellen aus der Glycerin-Stammkultur vor der Verwendung immer auf verschiedenen Nährmedien selektiert und somit ihre Identität überprüft.

Tabelle 2.7: Allgemeines Wachstumsverhalten des Hefestamms *sln1Δ* auf verschiedenen Selektionsmedien.

Selektionsplatten				Wachstum
CM	–Trp,	–Ura,	+Gal	+
CM	–His,	–Trp,	–Ura, +Gal	–
CM	–Trp,	–Ura,	+Glc	–
CM	–His,	–Trp,	–Ura, +Glc	–
CM	–Leu,	–Trp,	–Ura, +Gal	–

Mit einer Impföse wurde etwas Koloniematerial aus der gefrorenen Stammkultur entnommen, auf einer YP-Gal-Platte (Abschnitt 2.2.1) ausgestrichen und 60h bei 30°C inkubiert. Von dieser Platte wurden Einzelkolonien gepickt und wie in Tabelle 2.7 beschrieben, auf verschiedenen Selektionsplatten ausgestrichen. Nur Kolonien, die gemäß diesem Schema wuchsen, wiesen die phänotypischen Eigenschaften von *sln1Δ* auf und wurden für die Anzucht weiterverwendet.

## 2.3 Standardmethoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Zur Sterilisation und Inaktivierung von DNasen und RNasen wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen 20min bei 120°C autoklaviert (SANOclav, Schütt). Nicht hitzebeständige Materialien wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und anschließend mit 70%igem Ethanol (EtOH) ausgespült. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert. Vor allen Arbeiten mit RNA erfolgte eine gründliche Reinigung aller nichtautoklavierbaren Geräte sowie der Arbeitsfläche mit 0,1%igem SDS und eine zweite Autoklavierung aller autoklavierbaren Gegenstände. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Arbeiten mit

Nukleinsäuren grundsätzlich auf Eis durchgeführt. Bei der Verwendung von Kit-Systemen ist die Zusammensetzung der Lösungen in den Beschreibungen nachzulesen.

### 2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion diente zum Abtrennen von Proteinen aus Nukleinsäure-Präparationen (SAMBROOK U. RUSSEL 2001). Dafür wurde DNA-Lösung im Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,0) versetzt und unter kräftigem Vortexen emulgiert. Das Phenol/Chloroform-Gemisch für die Extraktion von RNA lag im Verhältnis 5:1 und mit einem pH-Wert von 4,3 vor. Eine Zentrifugation bei 16 000 x g (3min, Raunt. – Biofuge pico, Heraeus) unterstützte die Phasentrennung. Die wässrige Oberphase wurde erneut extrahiert, bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war. Im Anschluss erfolgte eine Alkoholpräzipitation wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

### 2.3.2 Alkoholpräzipitation

Wässrige DNA-Lösungen wurden in Gegenwart von 300mM Na-Acetat durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (100%, Rotisol) oder 0,7 Volumen Isopropanol (Raunt.) gefällt. Wurde mit EtOH gefällt, erfolgte nach gründlicher Durchmischung eine Inkubation bei -20°C (30min bis 16h) und die Pelletierung der DNA wurde bei 4°C vorgenommen (20 000 x g, 30min – 3K30, Sigma). Bei Verwendung von Isopropanol wurde nicht inkubiert und die Präzipitation erfolgte bei 20°C. Die Präzipitation von RNA wurde immer mit EtOH durchgeführt. Das DNA- bzw. RNA-Pellet wurde mit 70%igem EtOH (v/v) gewaschen und nochmals zentrifugiert (20 000 x g, 4°C, 10 min). Das Pellet wurde unter der Sterilbank bei Raumtemperatur getrocknet (5 bis 10 min) und in eine geeignete Menge Puffer aufgenommen. Dabei richteten sich Menge und Art des Puffers nach den Anforderungen des Folgeexperimentes.

### 2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei 260nm ( $OD_{260}$ ) bestimmt (UV/Vis-Spektrometer: GeneQuant II, Amersham-Pharmacia). Es wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1cm verwendet.

## 2 Material und Methoden

Eine Absorption von 1,0 entspricht ca. 50 $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA, 31 $\mu$ g/ml einzelsträngiger DNA oder 40 $\mu$ g/ml RNA (DAVIS ET AL. 1980). Bei einzelsträngigen Oligonukleotiden entspricht eine Absorption von 1,0 unter diesen Bedingungen einem Wert von 20 $\mu$ g/ml (SAMBROOK U. RUSSEL 2001). Bei Bedarf wurde zur Überprüfung des Reinheitsgrades zusätzlich die Absorption bei 280nm ( $OD_{280}$ ) bestimmt (Absorptionsmaximum von Proteinen). Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  beträgt für reine RNA bzw. DNA ca. 1,8 – 2,0 (SAMBROOK U. RUSSEL 2001), Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol verringern diesen Wert.

### 2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse und Auftrennung von Nukleinsäuren wurde das Prinzip der Gelelektrophorese angewendet. Ihre Durchführung erfolgte in horizontalen Flachbettapparaturen (GNA100, Amersham-Pharmacia und Agagel Standard G45/1, Biometra) unter der Verwendung von 1%igen (w/v) Gelen. Als Puffersystem diente 1x TAE und als Trägermaterial Agarose (Biomol), welche durch mehrfaches Aufkochen in TAE gelöst und nach Abkühlen auf unter 60°C in den Gelträger der Elektrophoresekommer gegossen wurde. Vor dem Auftragen wurden DNA- und RNA-Proben mit 0,2 Volumen Beschwererlösung versetzt. Bei der Auftrennung von RNA wurde zusätzlich unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Apparaturen wurden vor jedem Lauf gereinigt und der 50x TAE-Puffer in sterilem  $H_2O_{bidest}$  verdünnt. Die Auftrennung erfolgte bei 60 bis 80V, die Laufzeit wurde je nach Anforderung zwischen 1 und 2h variiert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Agarosegele in einem wässrigen Ethidiumbromidbad ca. 10 bis 20min gefärbt und ca. 5min in  $H_2O_{dest}$  gewaschen. Die Nukleinsäuren konnten anschließend auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254nm durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit einem Videoscanner (Geldokumentationsgerät von PHASE; verarbeitende Software: WinTV, Hauppauge) aufgenommen werden.

#### **50x TAE-Puffer (Stammlösung):**

2M Tris-Acetat  
50mM EDTA



### **Beschwererlösung:**

40% Saccharose (w/v) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
0,25% Bromphenolblau

### **Ethidiumbromid-Färbelösung:**

0,5µg Ethidiumbromid/ml 1x TAE-Puffer

## 2.3.5 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Größe von DNA-Fragmenten konnte nach der Gelelektrophorese anhand aufgetragener DNA-Längenstandards bestimmt werden. Für eine Bestimmung von Fragmenten zwischen 100 und 2 000bp wurde ein 100bp-Standard eingesetzt, dessen 500bp-Bande durch eine höhere Intensität leicht zu identifizieren ist (GeneRuler, MBI-Fermentas). In einigen Anwendungen kam ein 100bp-Standard von Amersham-Pharmacia zum Einsatz, der zwei intensivere Bande bei 800 und 3 000bp aufweist. Für größere Fragmente bis 10kb diente der '1kb DNA ladder' von Genecraft mit herausstechenden Banden bei 1 000 und 3 000bp.

## 2.4 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren wurden in der Regel mit käuflich erwerbbaaren Systemen isoliert und aufgereinigt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Die Zentrifugationsschritte erfolgten in der temperierbaren Zentrifuge 3K30 von Sigma und der Biofuge pico von Heraeus.

### 2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial wurde das 'NucleoSpin RNA Plant Kit' von Macherey & Nagel verwendet. 100 bis 200mg des tiefgefrorenen Pflanzenpulvers (Abschnitt 2.1.3) wurde in ein 1,5ml-E-Cup überführt und mit 350µl Puffer RA1 und 3,5µl β-Mercaptoethanol vermischt, um die Zellen zu lysieren. Dieses Lysat wurde auf den NucleoSpin Filter (im Kit enthalten) aufgetragen, 1min bei 10 000 × g zentrifugiert (Biofuge pico) und das Filtrat in ein neues E-Cup überführt. Nach dem

## 2 Material und Methoden

Vermischen mit 350  $\mu$ l 70%igem Ethanol wurde die RNA auf eine dem Kit beigelegte NucleoSpin Säule aufgetragen und 30s bei 8 000 x g zentrifugiert, um die Probe an der Silica-Membran der Säule zu binden. Die Membran wurde mit 350  $\mu$ l 'Membrane Desalting Buffer' (1min bei 10 000 x g zentrifugiert) auf den bevorstehenden DNaseI-Verdau vorbereitet.

Ein Aliquot mit 10  $\mu$ l DNaseI wurde mit 90  $\mu$ l DNase-Reaktionspuffer vermischt. 95  $\mu$ l dieses DNase-Reaktionsmixes wurden zentral auf die Silica-Membran pipettiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation wurde die DNaseI mit 200  $\mu$ l Puffer RA2 wieder inaktiviert und der Ansatz 30s bei 8 000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde in einem neuen Auffangröhrchen platziert und der Ansatz einmal mit 600  $\mu$ l (30s, 8 000 x g) und einmal mit 250  $\mu$ l Puffer RA3 gewaschen. Ein abschließender Zentrifugationsschritt von 2min bei 10 000 x g trocknete die Membran vollständig ab. Die RNA wurde mit 60  $\mu$ l RNase-freiem Wasser (im Kit enthalten) in ein neues 1,5ml-E-Cup eluiert. Dafür wurde das Wasser direkt auf die Membran pipettiert, 1min inkubiert und 1min bei 10 000 x g zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde direkt einem weiteren DNaseI-Verdau unterzogen (Abschnitt 2.5.1), da sie nicht vollständig frei von DNA war.

### 2.4.2 Isolierung von mRNA

Für die Isolierung von mRNA wurde das 'Fast Track 2.0 mRNA Isolation Kit' (Invitrogen) verwendet. Etwa 2g pulverisiertes Pflanzenmaterial (Abschnitt 2.1.3) wurde in ein 50ml-Greiner-Röhrchen mit 15ml 'Lysis Buffer' überführt. Das Gemisch wurde vorsichtig homogenisiert und 60min bei 45°C schwenkend inkubiert. Anschließend wurden 950  $\mu$ l 5M NaCl-Lösung zugefügt und durch Invertieren gemischt. Viermaliges Aufziehen der Probe mit einer sterilen 25ml Einwegspritze (Nadelgröße: 18 bis 21 gauge) zerkleinerte die chromosomale DNA durch Scherkräfte. Nach Zugabe von 75mg Oligo(dT)-Cellulose und zweiminütigem Quellen inkubierte der Ansatz erneut 60min schwenkend bei Raumtemperatur. Die Pelletierung der Cellulose erfolgte durch fünfminütige Zentrifugation (5 000 x g – 3K30). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mehreren Waschschritten unterzogen: Es wurde nacheinander vorsichtig in 20ml 'Binding Buffer', 10ml 'Binding Buffer' und 4x in 10ml 'Low Salt Buffer' resuspendiert. Dazwischen erfolgte jeweils eine Pelletierung der Oligo(dT)-Cellulose durch fünfminütige Zentrifuga-

## 2.4 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

tion ( $5\,000 \times g$ ) mit anschließender Dekantierung des Überstandes. Ein abschließender Zentrifugationsschritt diente zum Sammeln des restlichen Mediums, das dann mit einer Pipette abgesaugt wurde. Das Pellet wurde nun in  $800\,\mu\text{l}$  'Low Salt Buffer' aufgenommen, vollständig auf eine dem Kit beigelegte Säule gegeben und das Eluat nach zehnssekündiger Zentrifugation ( $5\,000 \times g$  – Biofuge pico) verworfen.

Mit  $3 \times 500\,\mu\text{l}$  'Low Salt Buffer' wurde die Cellulose gewaschen, wobei der Puffer mit einer sterilen Pipettenspitze in die Cellulose gerührt wurde. Jedem Waschschrift folgte eine zehnssekündige Zentrifugation bei  $5\,000 \times g$ , mit der anschließenden Entfernung des Eluates. Nach dem Waschen wurde die Säule in ein steriles, RNase-freies 1,5ml-E-Cup überführt und die mRNA von der Cellulose durch zweimalige Zugabe von  $200\,\mu\text{l}$  'Elution Buffer' eluiert. Auch hier wurde der Puffer in die Cellulose gemischt und die Säule 30s lang bei  $5\,000 \times g$  zentrifugiert. Der Durchfluss mit der enthaltenen mRNA wurde anschließend einer Ethanol-Fällung unterzogen. Dafür wurde die Probe mit  $60\,\mu\text{l}$  2M Na-Acetat und 1ml 96%igem Ethanol versetzt und ca. 2h bei  $-70^\circ\text{C}$  gefällt. Nach dem Auftauen wurde die Probe 15min bei  $20\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  (3K30) zentrifugiert. Das Ethanol wurde vollständig entfernt und das Pellet ca. 10min getrocknet. Die mRNA wurde in  $30\,\mu\text{l}$  'Elution Buffer' aufgenommen und in Aliquots bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

#### Isolierung von Plasmid-DNA mittels 'QIAGEN Plasmid Midi Kit'

Um große Mengen reiner Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das 'Plasmid Midi Kit' von QIAGEN verwendet. Die Anzucht plasmidhaltiger *E. coli*-Zellen erfolgte in Übernachtskultur in 20ml LB-Flüssigmedium mit Carbenicillin (Abschnitt 2.2.2). Die Zellen wurden zunächst durch fünfminütige Zentrifugation bei  $5\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  pelletiert (3K30). Nach der Entfernung des Mediums wurde das Pellet in 4ml Puffer P1 vollständig resuspendiert. Anschließend wurden 4ml Puffer P2 zugegeben und die Suspension nach vorsichtigem Invertieren 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vorgang lysierte die Zellen. Die Lyse wurde durch Zugabe von 4ml eiskaltem Puffer P3 abgestoppt und der Ansatz nach erneutem Invertieren 30min auf Eis inkubiert.

Mit einer dreißigminütigen Zentrifugation ( $20\,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde die Plasmid-DNA im Überstand von den übrigen sedimentierten Zellbestandteilen abgetrennt. Der Überstand

## 2 Material und Methoden

wurde sofort abgenommen und mit einer dem Kit beigelegten Säule ('QIAgen-tip' 100, max. Bindekapazität: 100 $\mu$ g) endgereinigt. Dafür wurde die Säule zunächst mit 4ml Puffer QBT äquilibriert, dann der Ansatz aufgetragen und anschließend 2x mit 10ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5ml Puffer QF in ein sauberes 1,5ml-E-Cup. Eine Fällung mit Isopropanol (Abschnitt 2.3.2) schloss sich an. Nach dem Trocknen wurde das DNA-Pellet in 100 bis 200 $\mu$ l 10mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen und die Konzentration photometrisch gemessen (Abschnitt 2.3.3).

### **Isolierung von Plasmid-DNA mittels 'Wizard Plus Miniprep Kit' (Promega)**

Diese Methode wurde verwendet, um bei einer großen Anzahl von Proben kleinere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren. Die Anzucht der *E. coli*-Zellen erfolgte in 10ml LB-Flüssigkulturen mit Carbenicillin über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37°C (Abschnitt 2.2.2). Die ausgewachsenen Kulturen wurden 5min auf Eis geschwenkt und anschließend je 2ml in ein 2ml-E-Cup gegeben. Durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 10 000 x g (Biofuge pico) wurden die Zellen pelletiert. War das Pellet sehr klein, wurden weitere 2ml der Übernachtskulturen im selben E-Cup geerntet. Der Überstand wurde mit einer Pipette vollständig abgezogen und die Pellets durch Vortexen in 250 $\mu$ l Resuspensionspuffer gelöst. Zur Lyse der Zellen wurden 250 $\mu$ l Lysispuffer zugegeben, vorsichtig invertiert, um eine Degradierung chromosomaler DNA durch Scherkräfte zu verhindern, und die Ansätze ca. 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 10 $\mu$ l Alkaliner Protease-Lösung wurden Proteine degradiert, die im Prozess der Lyse freigesetzt wurden. Die Ansätze wurden wieder invertiert und weitere 5min bei Raumtemperatur inkubiert. 350 $\mu$ l Neutralisierungslösung (invertieren) beendeten die Lyse, woraufhin die Ansätze 10min bei 10 000 x g zentrifugierten.

Der Überstand wurde vollständig auf eine dem Kit beigelegte Säule aufgetragen und eine Minute zentrifugiert (10 000 x g). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 $\mu$ l Waschlösung gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 1min bei 10 000 x g wurde der Durchfluss wieder entfernt. Ein zweiter Waschschriff mit 250 $\mu$ l Waschlösung schloss sich an. Die Säule wurde 2min durch Zentrifugieren getrocknet und anschließend in ein sauberes 1,5ml-E-Cup gegeben. 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> wurden in die Mitte der Säule pipettiert. Nach einer Minute Inkubation wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugieren (1min, 10 000 x g) von der Säule eluiert und die Konzentration photo-

metrisch bestimmt (Abschnitt 2.3.3). Die DNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt für nachfolgende Enzymreaktionen eingesetzt.

### **2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen**

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte über Nacht in 10ml Selektionsmedium (CM -His, -Trp, -Ura) mit 2% Galactose (Abschnitte 2.2.1 und 2.2.2). Die ausgewachsenen Kulturen wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 5 000 x g (3K30) in den Greiner-Röhrchen pelletiert und anschließend in 250µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Die Suspensionen wurden in 2ml-E-Cups umgefüllt, mit ca. 250µl 'Glas Beads' (425 bis 600 microns, Sigma) versetzt und anschließend 5min lang kräftig gevortext, um die Zellen aufzuschließen. Nach Zugabe von 250µl Lysispuffer wurde entsprechend dem Protokoll zur Plasmid-Isolierung mit dem 'Wizard Plus Miniprep Kit' in Abschnitt 2.4.3 fortgefahren.

### **2.4.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

#### **Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem 'QIAquick Gel Extraction Kit'**

Diese Methode ist geeignet, ausgewählte DNA-Fragmente zwischen 200bp und 10kbp nach einer Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese zu isolieren und aufzureinigen. Nach Auftrennung und Anfärbung der Fragmente (Abschnitt 2.3.4) wurde die aufzureinigende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit der dreifachen Menge (w/v) Puffer QG versetzt. Die Agarose schmolz durch zehnmünütige Inkubation des Ansatzes bei 50°C. DNA-Fragmente bis 4kbp wurden nun direkt auf die im Kit enthaltene Säule gegeben. Größere Fragmente wurden vorher mit einem Gel-Volumen Isopropanol versetzt. Der Ansatz in der Säule wurde 1min zentrifugiert (10 000 x g – Biofuge pico), um die DNA zu binden. Für den anschließenden Waschschrift wurden 0,75ml Puffer PE auf die Säule gegeben und erneut 1min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt und die Säule eine weitere Minute trockenzentrifugiert, um alle Alkoholreste aus dem Ansatz zu entfernen. Zum Eluieren wurde die Säule in ein sauberes 1,5ml-E-Cup überführt. In die Mitte der Säule wurden 50µl Puffer EB gegeben und nach einer Minute Einwirkzeit 1min lang zentrifugiert. Bei geringen DNA-Mengen wurde das Eluat ein zweites Mal auf die Säule gegeben und erneut abzentrifugiert.

### **Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem 'E.Z.N.A. Gel Extraction Kit'**

Diese Methode ermöglicht die Extraktion von DNA-Fragmenten bis zu 40kbp Länge aus Agarosegelen. Nach Auftrennung und Anfärbung der Fragmente (Abschnitt 2.3.4) wurde die aufzureinigende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit der vierfachen Menge (w/v) Binde-Puffer versetzt. Diese Mischung wurde unter gelegentlichem Vortexen 10min bei 65°C im Wasserbad inkubiert, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die DNA wurde direkt auf die dem Kit beigegefügte Säule gegeben und durch eine einminütige Zentrifugation (10 000 x g – Biofuge pico) an diese gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Probe durch Zugabe von 750µl DNA-Waschpuffer mit anschließender Zentrifugation (1min, Raumt., 10 000 x g) gewaschen. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und der Waschschrift einmal wiederholt. Anschließend wurde die Säule durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 10 000 x g vollständig getrocknet. Die Elution erfolgte mit 30 bis 50µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in ein sauberes 1,5ml-E-Cup.

### **Aufreinigung von DNA aus Enzymreaktionen mit dem 'E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit'**

Mit dieser Methode wurden alle Arten von Enzymreaktionen aufgereinigt, z.B. Dephosphorylierung, Ligation oder PCR. Dafür wurde der Reaktionsansatz mit 3 bis 6 Volumen CP-Puffer gemischt (je größer das aufzureinigende DNA-Fragment, umso weniger Puffer wurde eingesetzt) und auf eine im Kit enthaltene Zentrifugensäule aufgetragen. Ein einminütiger Zentrifugationsschritt bei 10 000 x g und Raumtemperatur (Biofuge pico) band die DNA an die Säule, während der Durchfluss verworfen wurde. Alle weiteren Schritte wurden wie in dem vorangehenden Abschnitt zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem 'E.Z.N.A. Gel Extraction Kit' durchgeführt.

## **2.5 Enzymatische Modifizierungen von Nukleinsäuren**

Die Enzymreaktionen wurden in einem Volumen ab 100µl in 1,5ml-E-Cups in einem Heizblock (Thermostat 5320, Eppendorf) durchgeführt. Kleinere Volumina inkubierten im Thermocycler 'Progene' (Thermodux). Alle Schritte zur Vorbereitung der Enzymreaktionen wurden grundsätzlich auf Eis durchgeführt.

### 2.5.1 DNaseI-Verdau

Um Gesamt-RNA zur Quantifizierung von Transkripten einsetzen zu können, muss sie vollständig frei von DNA sein. War dies nicht der Fall, schloss sich an die Isolierung grundsätzlich ein DNaseI-Verdau an. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen zusammengestellt und durch Vortexen vermischt.

#### DNaseI-Verdau:

RNA-Probe	58 $\mu$ l
10x MgCl <sub>2</sub> -Puffer	7 $\mu$ l
DTT (1mM)	0,7 $\mu$ l
RNase-Inhibitor (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
DNaseI (60U/ $\mu$ l)	7,37 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 70 $\mu$ l

Nach 20 Minuten Inkubation bei 37°C im Heizblock wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und direkt einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung unterzogen (Abschnitte 2.3.1 u. 2.3.2). Anschließend wurde die RNA photometrisch quantifiziert (Abschnitt 2.3.3) und in Aliquots bei -70°C eingefroren.

### 2.5.2 Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA sequenzspezifisch geschnitten werden. Der Restriktionsverdau erfolgte in den jeweils mitgelieferten Puffersystemen der Restriktionsenzyme, die in zehnfachen Stammlösungen vorlagen. Pro  $\mu$ g DNA wurden den Ansätzen 2 bis 10U Enzym zugegeben, wobei der Volumenanteil auf Grund des in der Enzymlösung enthaltenen Glycerins unter 0,1 gehalten werden musste, um die spezifische Enzymaktivität zu erhalten. Anschließend erfolgte eine ein- bis vierstündige Inkubation bei der für das eingesetzte Restriktionsenzym geeigneten Temperatur. Die Reaktionen wurden abgestoppt durch Erhitzen auf 80°C (20 min), durch Einfrieren der Ansätze bei -20°C oder durch Zugabe der Beschwererlösung für die Agarosegelelektrophorese, je nachdem, welche weitere Behandlung für die geschnittene DNA vorgesehen war. Alle Restriktionsverdaue wurden mittels der Flachbett-Gelelektrophorese untersucht (Abschnitt 2.3.4).

### 2.5.3 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um die Selbstligation von restriktionsgeschnittener Vektor-DNA in Ligationsansätzen zu verhindern. Mit Hilfe von alkaliner Phosphatase (CIAP) wurden dabei die 5'-Phosphatgruppen der endständigen Nukleotide entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte in 100  $\mu$ l-Ansätzen mit 20  $\mu$ l 5x CIAP-Puffer und mindestens 1U CIAP pro  $\mu$ g DNA. Die Ansätze wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgefüllt und 30min bei 37°C inkubiert. Durch zwanzigminütiges Erhitzen auf 75°C wurde die alkaline Phosphatase inaktiviert. Anschließend wurde die DNA mit dem 'E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit' (Abschnitt 2.4.5) aufgereinigt.

Die Dephosphorylierung konnte auch direkt nach einem Restriktionsverdau in dem MBI-Restriktionspuffersystem ohne vorherige Aufreinigung durchgeführt werden (1  $\mu$ l CIAP in 100  $\mu$ l Restriktionsverdau). Dafür musste allerdings sichergestellt sein, dass die Restriktionsenzyme vorher thermisch deaktiviert wurden (Abschnitt 2.5.2).

### 2.5.4 Ligieren von DNA-Fragmenten

Diese Enzymreaktion dient dem Verknüpfen von DNA-Enden, wobei überhängende Enden zueinander komplementär sein müssen. Die zu ligierenden DNA-Enden können auch glatt sein, was allerdings zu einem erheblichen Effizienzverlust bei der Reaktion führt. Für eine erfolgreiche Ligation benötigt wenigstens ein Strang einen 5'-Phosphatrest.

#### Ligieren mit T4 DNA-Ligase

Die Ligation mit dem Enzym T4 DNA-Ligase wurde durchgeführt, wenn das zu ligierende Insert und der entsprechende linearisierte Plasmid-Vektor an zueinander passenden Restriktionsschnittstellen zusammengefügt werden sollten. Dafür waren die Enden des Vektors in der Regel dephosphoryliert (Abschnitt 2.5.3), die Inserts dagegen nicht. Da die Inserts während der Ligation zur Bildung von Polymeren neigten, die Plasmide aufgrund ihrer Dephosphorylierung jedoch so gut wie gar nicht mit sich selbst ligierten, wurde abweichend von der allgemeinen Praxis ein molares Vektor : Insert-Verhältnis von 1:1 eingestellt. Der Standardansatz von 20  $\mu$ l wurde in der angegebenen Reihenfolge pipettiert.



### Standard-Ligation:

Vektor (100 – 500ng)	x $\mu$ l
Insert (gleiche molare Menge)	y $\mu$ l
10x Ligations-Puffer	2 $\mu$ l
T4 DNA-Ligase (5U/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 18 $\mu$ l

Auch für die Ligation von überhängenden DNA-Enden wurde immer mit Polyethylenglycol (PEG) gearbeitet. Da kaltes PEG allerdings zum Ausfällen von DNA führen kann, wurde der oben beschriebene Ansatz bei Raumtemperatur mit 2  $\mu$ l auf Raumtemperatur angewärmtem 50% PEG 4 000 komplettiert. Der Reaktionsansatz wurde durch Vortexen vermischt und 16h bei 16°C im Thermocycler inkubiert. Durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 70°C wurde die Ligase inaktiviert.

### Ligieren von PCR-Produkten mit dem 'TOPO TA Cloning Kit' (Invitrogen)

Diese Methode wurde zum Klonieren von PCR-Produkten eingesetzt, die aufgrund der spezifischen Funktionsweise der *Taq* DNA-Polymerase mit einem einzelnen überhängenden 3'-Adenin ausgestattet sind. Der im Kit enthaltene linearisierte Vektor (pCR2.1-TOPO, Tabelle 2.5) ist mit 3'-Deoxythymidinresten ausgestattet, was eine passgenaue Ligation mit dem *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkt ermöglicht. An dem 3'-Phosphatrest dieses überhängenden Thymidins ist das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden. Diese Bindung wird durch die 5'-Hydroxylgruppe des amplifizierten PCR-Produktes angegriffen, was zu einer Verbindung der beiden DNA-Stränge und einer Freisetzung der Topoisomerase führt.

Je nach Anforderung des Experiments wurde das PCR-Produkt entweder ungereinigt für die Ligation eingesetzt oder mit dem 'E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit' (Abschnitt 2.4.5) bzw. über ein Agarosegel (Abschnitt 2.3.4) aufgereinigt. 2  $\mu$ l der zu klonierenden DNA wurde mit 0,5  $\mu$ l 1:10 verdünnter Salz-Lösung und 0,5  $\mu$ l Vektorlösung versetzt, kurz vermischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis abgekühlt und sofort vollständig für die Elektroporation eingesetzt. Die Transformation wurde wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben durchgeführt, die transformierten Zellen jedoch nur in 250  $\mu$ l SOC-Medium aufgenommen.

## 2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die verschiedenen PCR-Ansätze wurden abhängig von der Art der Untersuchung in 10  $\mu$ l oder 20  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Die 10  $\mu$ l Volumen kamen bei Routinereaktionen, wie dem PCR-Kolonie-'Screening' oder der Analyse von Plasmiden mit gen- oder plasmid-spezifischen Primern zum Einsatz. Bei der Verwendung von degenerierten Primern oder dem 'Screening' von Hefekolonien wurden 20  $\mu$ l Volumen angesetzt. Wurden keine anderen Angaben gemacht, wurde die *Taq* DNA-Polymerase von MBI-Fermentas verwendet. Es wurde mit zwei PCR-Geräten mit Deckelheizung gearbeitet (Progene, Thermodux und Primus HE Thermocycler, MWG-Biotech). Die PCR-Ansätze wurden grundsätzlich auf Eis pipettiert, wobei die jeweils gleichen Bestandteile vorher in einem Master Mix vereinigt und anschließend auf die PCR-Cups verteilt wurden. Durch die Zugabe der individuellen Bestandteile wurden die Ansätze komplettiert, anschließend gemischt, kurz abzentrifugiert und in das vorgeheizte PCR-Gerät gestellt. Nach Beendigung des PCR-Programmes (Anhang B) wurden die Proben bei -20°C gelagert oder sofort zur Analyse im Agarosegel aufgetrennt.

### Der Standard-PCR-Ansatz:

10x PCR-Puffer	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,6 $\mu$ l
DMSO (10%)	2 $\mu$ l
dNTP-Mix (jeweils 2mM)	1 $\mu$ l
Forward Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
Reverse Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,06 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 9 $\mu$ l
Template (Plasmid-DNA, 10pg)	1 $\mu$ l

### 2.6.1 PCR-Kolonie-'Screening'

Diese Methode wurde zur schnellen Überprüfung von rekombinanten Klonen verwendet. Zu diesem Zweck wurde etwas Koloniematerial als Template mit einem Holzstäbchen von einer Agar-Platte direkt in dem PCR-Ansatz suspendiert.

### Standard-Ansatz für das 'Screening' von Bakterienkolonien:

10x PCR-Puffer	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,6 $\mu$ l
DMSO (10%)	2 $\mu$ l
dNTP-Mix (jeweils 2mM)	1 $\mu$ l
Forward Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
Reverse Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,06 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 10 $\mu$ l
Template: Koloniematerial	

Bei dem 'Screening' von Hefekolonien wurde der Mastermix zunächst ohne Polymerase angesetzt, auf die PCR-Gefäße verteilt und das Koloniematerial zugegeben. Um die Zellen aufzuschließen, wurden die Ansätze 10min bei 94°C im Thermocycler erhitzt und erst dann die Polymerase auf 0,3U/ $\mu$ l verdünnt und in einem manuellen Hotstart zu den Ansätzen gegeben.

### Standard-Ansatz für das 'Screening' von Hefekolonien:

10x PCR-Puffer	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,2 $\mu$ l
DMSO (10%)	4 $\mu$ l
dNTP-Mix (jeweils 2mM)	2 $\mu$ l
Forward Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
Reverse Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 18 $\mu$ l
Template: Koloniematerial	
10min bei 94°C, anschließend Zugabe von	
DNA-Polymerase (verd. auf 0,3U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l

### 2.6.2 'Screening' von cDNA-Banken mit degenerierten Primern

Unter dem 'Screening' von cDNA-Banken versteht man das systematische Durchsuchen aller enthaltenen Klone nach spezifischen Sequenzen. Im Gegensatz zum PCR-Kolonie-'Screening' mit spezifischen Primern wurden die Plasmide der Klone in den Stammkulturen hier isoliert und aufgereinigt, um unspezifische Wechselwirkungen mit genomischer DNA von *E. coli* zu minimieren.

## 2 Material und Methoden

### Standard-Ansatz:

10x PCR-Puffer	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,2 $\mu$ l
dNTP-Mix (jeweils 2mM)	2 $\mu$ l
Forward Primer (10 – 270pmol)	x $\mu$ l
Reverse Primer (10 – 270pmol)	x $\mu$ l
DNA-Template (100ng)	1 $\mu$ l
DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,12 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 $\mu$ l

Zu diesem Zweck wurden LB-Flüssigkulturen (20ml mit Carbenicillin) mit 10 $\mu$ l Stammkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser ausgewachsenen Flüssigkultur wurde eine Plasmid-Präparation mit dem 'QIAGEN Plasmid Midi Kit' durchgeführt (Abschnitt 2.4.3) und die DNA-Konzentration spektrophotometrisch erfasst (Abschnitt 2.3.3). 100ng wurden als Template für die PCR (PCR-Programme in Anhang B) mit degenerierten Primern (Anhang C) eingesetzt. Je höher der Degenerierungsgrad der Primer, umso größer war die eingesetzte Menge.

### 2.6.3 Verschachtelte ('nested') PCR

Bei einer verschachtelten oder 'nested' PCR wurden nacheinander zwei Reaktionen durchgeführt, wobei in der zweiten (inneren) PCR das PCR-Produkt der ersten (äußeren) als Template diente. Diese Methode wurde dann angewandt, wenn die zu amplifizierende Sequenz in dem Template in so geringer Konzentration enthalten war, dass nach einer einzelnen PCR noch nicht genug Material amplifiziert wurde, um eine sichtbare Bande zu erzeugen. Andererseits wurde die 'nested' PCR durchgeführt, wenn die Primer so stark degeneriert waren, dass sie nach der ersten PCR kein klares Signal erzeugten. Die PCR-Ansätze entsprachen je nach Primerwahl den Standardansätzen für eine PCR mit spezifischen oder degenerierten Primern. Das PCR-Produkt der äußeren PCR wurde je nach Effizienz der Reaktion 1:100 oder 1:1 000 verdünnt und 1 $\mu$ l als Template für die innere Reaktion verwendet. Dabei lagen die bereits amplifizierten Sequenzen im Vergleich zu den nicht amplifizierten in einer höheren Konzentration vor, konnten so in der zweiten Reaktion bevorzugt als Matritze für die Polymerase dienen und ein deutliches Signal erzeugen. Wichtig war dabei, dass das Primerpaar für die innere PCR in der Sequenz innerhalb des Paares für die äußere PCR lag.

## 2.7 Transfer von DNA

### 2.7.1 Transformation von Bakterien

#### Herstellung und Lagerung elektrokompetenter Zellen

Eine Vorkultur in 20ml LB (ohne Antibiotikum) wurde mit dem gewünschten Bakterienstamm versetzt und über Nacht angezogen. Mit 5ml dieser Vorkultur wurden 500ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 0,9 erreicht war. Für die Ernte wurden die Kulturen 5min im Eiswasser geschwenkt und anschliessend 5min bei 4 000 x g und 4°C pelletiert (3K30). Das Medium wurde möglichst vollständig entfernt und die Pellets zweimal durch vollständige Resuspendierung in 500ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> mit anschließender Zentrifugation bei 5 000 x g gewaschen. Danach wurden sie in insgesamt 10ml 15%igem Glycerin (w/v) aufgenommen, vereinigt und bei 5 000 x g erneut pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500µl 15%igem Glycerin erneut resuspendiert (Endvolumen ca. 1ml). Diese Zellsuspension wurde in vorgekühlten 0,5ml-E-Cups aliquotiert (40µl-Aliquots) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Die kompetenten Zellen wurden getestet, indem ein 40µl-Aliquot mit 250ng pUC18 (Tabelle 2.5) ungeschnitten und ohne Insert transformiert wurde.

#### Elektroporation

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Elektroporation (*E. coli* Pulser, BIO-RAD). Dafür wurden pro Transformation je ein Aliquot Zellen auf Eis langsam aufgetaut und mit 2 bis 10µl der zu transformierenden DNA vermischt. Nach einer Ruhezeit von einer Minute wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2cm Durchmesser) überführt und einer pulsartigen Spannung von 2,5kV ausgesetzt (fest eingestellt: 5ms, 200Ω). Unmittelbar darauf wurden die Zellen in der Küvette mit 960µl SOC-Medium aufgenommen, in ein 15ml-Greiner-Röhrchen überführt und 1h bei 37°C regeneriert (im Schüttelwasserbad bei 225U/min). Alle Schritte wurden zügig hintereinander durchgeführt, was sich entscheidend auf die Qualität der Elektroporation auswirkte. Anschließend wurden die Zellen zum Auszählen und Analysieren in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf LB-Platten mit Carbenicillin oder X-Gal-Platten

## 2 Material und Methoden

ausplattiert (Abschnitt 2.8.4). Durch den Antibiotikagehalt der Agarplatten erfolgte eine Selektion der Transformanden, da sich nur die Zellen vermehren konnten, die zuvor durch Transformation ein Plasmid mit codierter Antibiotikaresistenz erhalten hatten. Das Ausplattieren auf X-Gal-Platten ermöglichte darüber hinaus die Funktion des Blau-Weiß-‘Screenings’ (SAMBROOK U. RUSSEL 2001). Dabei lassen Plasmide, die das LacZ-Gen besitzen, eine Aussage darüber zu, ob sie ein Insert enthalten. Das codierte Enzym  $\beta$ -Galactosidase setzt das farblose X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Bei einem leeren Plasmid ist das LacZ-Gen intakt und die Kolonien färben sich blau. Enthält das transformierte Plasmid jedoch ein Insert, ist das LacZ-Gen unterbrochen und die Kolonien bleiben weiß. Zur Herstellung von Stammkulturen konnte der Transformationsansatz in LB-Flüssigkultur mit Carbenicillin bei 37°C über Nacht angezogen werden (Abschnitt 2.2.2).

### SOC-Medium:

Trypton	4g	Nach dem Autoklavieren Zugabe von:		
Hefeextrakt	1g			
NaCl	0,1g		1M MgCl <sub>2</sub>	2ml
KCl	0,04g		1M MgSO <sub>4</sub>	2ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 200ml		2M Glucose	2ml

### 2.7.2 Transformation von Hefen

Bei dem verwendeten Hefestamm handelte es sich um die Mutante *S. cerevisiae sln1Δ*. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte zur Herstellung und Transformation der kompetenten Zellen bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden frisch aus den jeweiligen Stammlösungen hergestellt.

#### Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Je ein ca. 2cm langer Strich Koloniematerial wurde nach vorheriger Selektion (Abschnitt 2.2.3) von einer CM-Dropout-Platte mit Galactose ohne Trp und Ura entnommen und in zwei 500ml-Erlenmeyerkolben mit je 50ml CM-Dropout-Flüssigmedium mit 2% Galactose ohne Trp und Ura resuspendiert (Abschnitt 2.2.1). Die Anzucht erfolgte in einem 30°C warmen Schüttelwasserbad bei 250U/min bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 (etwa 18h). Mit jeder dieser zwei Vorkulturen wurden nun 300ml YPA-Gal-Medium beimpft und weitere

3h inkubiert, bis ihre  $OD_{600}$  etwa 0,6 betrug. Das gesamte Zellmaterial wurde durch Zentrifugieren ( $4000 \times g$  für 5min) bei Raumtemperatur pelletiert und das Medium mit einer Pipette vollständig entfernt. Zum Waschen wurden die Pellets in 100ml sterilem  $H_2O_{bidest}$  vollständig resuspendiert, vereinigt und bei  $5\,000 \times g$  erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 2ml TE-LiAc Puffer aufgenommen und direkt für die Transformation durch Hitzeschock eingesetzt. Die auf diese Weise geerntete Menge kompetenter Zellen reichte für vier Transformationsansätze.

### TE-LiAc Puffer:

10x TE Puffer	1 Vol.
10x Lithiumacetatlösung	1 Vol.
$H_2O_{bidest}$	8 Vol.

### 10x TE-Puffer:

100mM Tris, pH 7,5  
mit verd. Essigsäure eingestellt

### 10x Lithiumacetatlösung:

1M Lithiumacetat, pH 7,5  
mit verd. Essigsäure eingestellt

## DNA-Aufnahme durch Hitzeschock

Für die Transformation der kompetenten Hefezellen wurden die einzelnen Komponenten in der folgenden Reihenfolge in ein 15ml-Greiner-Röhrchen gegeben und durch Vortexen vermischt.

### Standardansatz für die Hefetransformation:

kompetente Hefezellen	1ml
einzelsträngige Träger-DNA aus Lachssperma	2mg
Plasmid-DNA	$10\mu g$
TE-LiAc-PEG Lösung	6ml

Die Transformationsansätze wurden sofort 30min bei  $30^\circ C$  inkubiert und anschließend für genau 15min einem Hitzeschock bei  $42^\circ C$  unterzogen (vorgewärmte Wasserbäder; 250U/min). Nach 10min Abkühlphase auf Eis wurden die Ansätze 5min bei  $1\,000 \times g$  und  $20^\circ C$  zentrifugiert und der Überstand vollständig mit einer 5ml-Pipette abgezogen. Die Pellets wurden in 2ml frisch hergestelltem 1x TE-Puffer resuspendiert, jeweils  $200\mu l$  auf Agarplatten mit CM-Selektionsmedium (Abschnitt 2.2.1) ausplattiert und 60h bei  $30^\circ C$  inkubiert.

### TE–LiAc–PEG Puffer:

10x TE Puffer	1 Vol.
10x Lithiumacetatlösung	1 Vol.
50% PEG	8 Vol.

### 50% PEG-Lösung (w/v):

Polyethylenglycol	50g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50ml

## 2.8 Konstruktion einer cDNA-Expressionsbibliothek

cDNA-Bibliotheken enthalten im Gegensatz zu genomischen Banken nur Sequenzen von Genen, die zuvor transkribiert wurden. Damit lässt sich die Anzahl der zu untersuchenden Gene minimieren, was beim systematischen Durchsuchen der Bank nach ganz bestimmten Genen von Vorteil ist. Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde das 'pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit' von Stratagene verwendet, welches eine gerichtete Klonierung in 'sense'-Orientierung in den verwendeten Vektor pBluescript-SK(+) ermöglicht. Als Ausgangsmaterial dienten 5 µg mRNA aus dem Hypokotyl 7 Tage alter etiolierter Kürbiskeimlinge, die mit Hilfe des 'Fast Track 2.0 mRNA Isolation Kit' isoliert wurden (Abschnitt 2.4.2). Alle verwendeten Reaktionskomponenten waren Bestandteile des Kits, sofern sie nicht anders bezeichnet sind und alle Schritte ohne weitere Angaben wurden auf Eis durchgeführt.

### 2.8.1 Herstellung und enzymatische Bearbeitung doppelsträngiger cDNA

In der Erststrangsynthese wurde die mRNA in einer Reversen Transkriptase Reaktion unter Verwendung eines Hybrid Oligo(dT) Linker-Primers in einzelsträngige methylierte cDNA umgeschrieben und dabei eine unmethylierte *Xho*I-Schnittstelle an den PolyA-Schwanz angefügt. Der Reaktionsansatz wurde in der unten angegebenen Reihenfolge zusammengestellt und nach der Zugabe der Reversen Transkriptase 1h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Erststrangsynthese direkt als Template für die Zweitstrangsynthese eingesetzt, in der mit Hilfe von Polymerase I hemimethylierte doppelsträngige cDNA hergestellt wurde.



### Erststrangsynthese:

10x First-Strand Buffer	5 $\mu$ l
First-Strand Methyl Nucleotide Mix <sup>6)</sup>	3 $\mu$ l
Linker Primer (1,4 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
DEPC-behandeltes Wasser	7,5 $\mu$ l
RNase-Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
mRNA (5 $\mu$ g)	30 $\mu$ l

10min Inkubation bei Raumt.,  
anschließend Zugabe von

MMLV-Reverse Transkriptase (50U/ $\mu$ l)	1,5 $\mu$ l
---	-------------

### Zweitstrangsynthese:

Erststrangsynthese	45 $\mu$ l
10x Second-Strand Buffer	20 $\mu$ l
Second-Strand dNTP-Mix (jeweils 10mM)	6 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	116 $\mu$ l
RNase H (1,5U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
DNA-Polymerase I (9U/ $\mu$ l)	11 $\mu$ l

Die Zweitstrangsynthese wurde auf 4 PCR-Cups verteilt und 2,5h bei 16°C im Thermocycler inkubiert. Die überhängenden Enden der hemimethylierten doppelsträngigen cDNA wurden im nächsten Schritt mit *pfu* DNA-Polymerase geglättet. Dafür wurden die 200 $\mu$ l des Zweitstrangansatzes mit 23 $\mu$ l 'Blunting dNTP-Mix' sowie 2 $\mu$ l der Polymerase versetzt und 30min bei 72°C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Abschnitt 2.3.1) und abschließend eine Extraktion mit Chloroform im Verhältnis 1:1, um eventuell verbliebene Phenolreste zu entfernen. Die Probe wurde dann zwei Tage lang mit 20 $\mu$ l 3M Natriumacetat und 500 $\mu$ l 100%igem EtOH (Rotisol) bei -20°C präzipitiert und anschließend 60min bei 20 000 x g und 4°C pellettiert (3K30). Das Pellet wurde noch einmal mit 500 $\mu$ l 70% EtOH versetzt, 2min bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend 30min bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Resuspendieren des Pellets erfolgte eine Zugabe von 9 $\mu$ l *Eco*RI-Adapterarmlösung und eine einstündige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen. Diese Adapterarme enthalten eine *Eco*RI-Schnittstelle am Ende, die der späteren Ligation der cDNA in den Vektor dient. Für die Ligation der Adapterarme mit den *Eco*RI-Enden an die cDNA wurde der folgende Ansatz über Nacht bei 8°C im Thermocycler inkubiert.

<sup>6)</sup>enthält 10mM dATP, dGTP und dTTP plus 5mM 5-methyl-dCTP

## 2 Material und Methoden

### Ligation der *EcoRI*-Adapterarme:

geglättete cDNA in <i>EcoRI</i> -Adapterlösung	9 $\mu$ l
10x Ligase-Puffer	1 $\mu$ l
rATP (10mM)	1 $\mu$ l
T4 DNA-Ligase (4U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Die Ligase wurde durch eine nachfolgende Inkubation von 30min bei 70°C inaktiviert, kurz anzentrifugiert und für 5min auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Anschließend erfolgte eine Phosphorylierung der *EcoRI*-Enden an den Adapterarmen.

### Phosphorylierung der *EcoRI*-Enden:

Ligationsansatz	12 $\mu$ l
10x Ligase-Puffer	1 $\mu$ l
rATP (10mM)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	6 $\mu$ l
T4 Polynucleotid-Kinase (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Der Phosphorylierungsansatz inkubierte 30min bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Kinase weitere 30min bei 70°C inkubiert, kurz anzentrifugiert und 5min bei Raumtemperatur heruntergekühlt.

Beide Enden der cDNA waren nun durch die vorangegangenen enzymatischen Modifizierungen mit phosphorylierten *EcoRI*-Enden versehen. Für eine gerichtete Klonierung ist jedoch ein Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsschnittstellen notwendig. Deshalb wurde der Ansatz abschließend noch mit *XhoI* verdaut. Die hemimethylierte cDNA war vor dem Restriktionsenzym sicher, ein Zerschneiden der Gene konnte also nicht stattfinden. Die *XhoI*-Schnittstelle in den Hybrid Oligo(dT) Linker-Primern war allerdings nicht methyliert. So führte ein *XhoI*-Verdau also zu cDNA, die am 5'-Ende der Gene eine *EcoRI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle enthielten. Für den *XhoI*-Verdau wurden dem Kinaseansatz folgende Komponenten hinzugefügt: 28  $\mu$ l 'XhoI-Buffer Supplement' und 3  $\mu$ l Restriktionsenzym (40U/ $\mu$ l). Nach 90min Inkubation bei 37°C präzipitierte der Ansatz unter Zugabe von 5  $\mu$ l 10x STE-Puffer und 125  $\mu$ l 100% EtOH (Rotisol) erneut über Nacht bei -20°C. Am nächsten Morgen wurde die DNA 60min bei 20 000 x g und 4°C pellettiert (3K30), getrocknet und vollständig in 14  $\mu$ l 1x STE-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 3,5  $\mu$ l blau gefärbten Ladepuffers wurde die so vorbehandelte Probe nun direkt zur Größenfraktionierung eingesetzt (Abschnitt 2.8.2).

### 2.8.2 Größenfraktionierung und Quantifizierung

Bevor die vorbereitete cDNA in den Vektor ligiert wurde, erfolgte durch die Auftrennung über eine Sepharose-Säule eine Größenfraktionierung. Dadurch konnten zum einen die im Ansatz befindlichen übrig gebliebenen Linker-Primer und *EcoRI*-Adapterarme von der cDNA abgetrennt werden und zum anderen die cDNA-Moleküle der gewünschten Größe gezielt ligiert und transformiert werden.

Die Größenfraktionierung erfolgte in einer 1ml-Einwegpipette aus Plastik (Serologische Pipette, Roth), die luftblasenfrei mit Sepharose CL-2B Gelfiltrationsmedium gefüllt wurde. Die 'Säule' wurde mit 10ml 1x STE-Puffer äquilibriert und anschließend die cDNA-Probe aus Abschnitt 2.8.1 mit Hilfe einer Pipette aufgetragen. Nachdem die Probe von der Sepharose aufgenommen worden war, wurden weitere 3ml 1x STE-Puffer zugegeben. Die Sepharose-gefüllte Säule trennt die aufgetragenen Moleküle der Größe nach auf, wobei sie umso schneller von der Säule eluieren, je größer sie sind. Anhand des blauen Ladepuffers konnte die Auftrennung verfolgt werden. Als die untere Kante der Markerfarbe die -0,40ml-Markierung der Pipette erreichte, wurde die erste Fraktion aufgefangen. Jede Fraktion enthielt drei Tropfen, was etwa 130  $\mu$ l entsprach. Es wurden 11 Fraktionen aufgefangen, bis die untere Kante der Farbe den Auslauf der Säule erreichte. Jeweils 13  $\mu$ l der Fraktionen wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und ihr Laufverhalten per Augenmaß abgeschätzt. Aufgrund dieser Gelanalyse wurde entschieden, dass die Fraktionen 4 bis 7 für die Ligation in den Vektor weiter verarbeitet wurden. Die ausgewählten Fraktionen 4 bis 7 wurden in einer Phenol/Chloroform-Extraktion (Abschnitt 2.3.1) mit abschließender Chloroform-Extraktion im Verhältnis 1:1 aufgereinigt. Nach einer Präzipitation mit 100% EtOH (Rotisol) über Nacht (Abschnitt 2.8.1) wurde die getrocknete cDNA der einzelnen Fraktionen in je 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Um die Konzentration der größenfraktionierten cDNA zu bestimmen, wurde eine Visualisierung unter UV-Licht durch das Auftragen kleiner Mengen DNA auf einer mit Ethidiumbromid (EtBr) angereicherten Agaroseplatte vorgenommen ('Ethidium-Bromid Plate Assay').

Zur Herstellung der EtBr-Agaroseplatten wurden 100ml einer 0,8%igen Agaroselösung in 1x TAE-Puffer angesetzt (Abschnitt 2.3.4). Die geschmolzene Agarose wurde abgekühlt, 10  $\mu$ l EtBr-Stammlösung (10mg/ml) hineingemischt und die fertige Lösung in 90mm-Petrischalen gefüllt (ca. 20ml pro Platte). Nachdem die Platten ausgehärtet wa-

## 2 Material und Methoden

ren, konnte die DNA für die Konzentrationsbestimmung aufgetragen werden. Jeweils 0,5µl der Fraktionen 4 bis 7 wurden mit Hilfe einer Pipette in der Mitte der Platte aufgetragen. Außen befanden sich DNA-Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen zum quantitativen Vergleich<sup>7)</sup>. Die Platte wurde auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert (Abschnitt 2.3.4).

### 2.8.3 Ligation und Transformation

Für die Ligation wurde die quantifizierte cDNA (Abschnitt 2.8.2) auf eine Konzentration von 5ng/µl verdünnt und mit den folgenden weiteren Komponenten in je einem Ligationsansatz pro Fraktion eingesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 12°C im Thermocycler inkubiert und anschließend bis zur Transformation bei -20°C eingefroren.

#### Ligationsansatz:

größenfraktionierte cDNA (10ng)	2µl
10x Ligase-Puffer	0,5µl
rATP (10mM, pH 7,5)	0,5µl
pBluescript-SK(+) (20ng)	1µl
T4 DNA-Ligase (4U/µl)	0,5µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 5µl

Es wurden vier Transformationsansätze mit den ligierten cDNA-Fractionen 4 bis 7 durchgeführt. Die Ligationsansätze und eine entsprechende Anzahl Aliquots kompetenter Zellen wurden unter sanftem Vortexen auf Eis aufgetaut. 100µl der kompetenten Zellen pro Transformation wurden in vorgekühlte 15ml-Greiner-Röhrchen gegeben. Nach der Zugabe von 4µl XL10-Gold β-Mercaptoethanol-Mix pro Ansatz wurden die Zellen 10min auf Eis inkubiert und alle 2min gevortext. Anschließend wurde jeweils der gesamte Ligationsansatz zugefügt, erneut gemischt und weitere 30min auf Eis inkubiert. Die Transformation der XL10-Gold ultrakompetenten Zellen erfolgte mittels Hitzeschock mit einem Hitzeimpuls von exakt 30s bei 42°C in einem vorgeheizten Wasserbad. Anschließend wurden die Ansätze für 2min auf Eis gestellt und danach durch die Zugabe von je 0,9ml NZY<sup>+</sup>-Medium (vorgeheizt auf 42°C) auf 1ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Eine einstündige Inkubation bei 37°C und 250U/min in einem vorgeheizten Wasserbad diente der Regeneration

---

<sup>7)</sup>Es wurden folgende Mengen des Plasmids pUC18 (HANNA ET AL. 1984) verwendet: je 0,5µl der Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100µg/µl.

der transformierten Zellen, bevor sie zum Auszählen auf X-Gal-Platten ausplattiert und zum Amplifizieren in 20ml LB-Flüssigmedium mit Carbenicillin angezogen wurden.

### NZY<sup>+</sup>-Medium:

NZ-Amine (Casein-Hydrolysat)	1g	Nach dem Autoklavieren Zugabe von:	
Hefeextrakt	0,5g	1M MgCl <sub>2</sub>	1,25ml
NaCl	0,5g	1M MgSO <sub>4</sub>	1,25ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100ml	2M Glucose	1ml

### 2.8.4 Die Qualität der cDNA-Bibliothek

Die Qualität einer cDNA-Bibliothek ist für das erfolgreiche Durchsuchen nach spezifischen Genen von entscheidender Bedeutung und lässt sich anhand der Anzahl unterschiedlicher Klone sowie der Größe der Inserts ausdrücken. Die Effizienz der Transformation wurde bestimmt, indem 10  $\mu$ l der Transformationsansätze nach der einstündigen Regeneration in LB-Flüssigmedium + Carbenicillin verdünnt und in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf X-Gal-Platten ausplattiert wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend ausgezählt. Eine Stunde nach der Transformation kann davon ausgegangen werden, dass sich die transformierten Zellen noch nicht geteilt haben. Daher sollte jede gezählte Kolonie tatsächlich einen individuellen Klon repräsentieren. Die Anzahl der ausplattierten Kolonien wurde auf das Volumen des Transformationsansatzes hochgerechnet, woraus die Zahl der unabhängigen Klone in jeder Fraktion der gesamten cDNA-Bank ermittelt wurde. Die Größe der cDNA-Fragmente in den Plasmiden der cDNA-Bank-Fraktionen 4 bis 7 wurde durch ein PCR-Kolonie-'Screening' (Abschnitt 2.6.1) ermittelt. Dafür wurden je zehn weiße Kolonien (Abschnitt 2.6.1) mit M13-Primern (Anhang C) untersucht. Der Rest der Transformationsansätze wurde über Nacht in LB-Flüssigmedium mit Carbenicillin vermehrt und als amplifizierte cDNA-Expressionsbibliothek in Form von Glycerin-Stammkulturen gelagert (Abschnitt 2.2.2).

### Quantifizierung der Stammkulturen

Neben der Anzahl der unterschiedlichen Klone in dem Transformationsansatz war es außerdem erforderlich, die absolute Zahl der 'colony forming units' (cfu) in einem bestimmten Volumen der amplifizierten Stammkulturen zu bestimmen. Diese wurde ermit-

telt, indem 10  $\mu$ l der Stammkultur, mit LB-Flüssigmedium + Carbenicillin verdünnt, auf X-Gal-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Die ausgezählten Kolonien wurden auf das Volumen der Stammkultur bezogen, so dass durch Umrechnen ermittelt wurde, welches Volumen für eine bestimmte Anzahl von cfu verwendet werden musste.

## 2.9 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

In diesem Abschnitt wird das 'Screening' (systematisches Durchsuchen) einer cDNA-Expressionsbibliothek aus dem Hypokotyl 7 Tage alter etiolierter Kürbiskeimlinge (Abschnitt 2.8) nach einer Histidin-Kinase beschrieben. Zunächst wurde mit degenerierten, später mit genspezifischen Primern vorgegangen. Die cDNA-Bibliothek war größenfraktioniert und enthielt in Fraktion 4 ungefähr 100 000 verschiedene Klone mit Inserts von etwa 1 000 bis 5 000bp Größe. Da das Vorhandensein einer rezeptorähnlichen Histidin-Kinase mit ca. 3kbp Größe in dieser Fraktion am wahrscheinlichsten war, beschränkte sich das 'Screening' auf diese Fraktion.

### 2.9.1 PCR-basiertes 'Screening' mit degenerierten Primern

Es wurden degenerierte Primer entwickelt, die spezifisch die sensorischen Proteine des Zwei-Komponentensystems amplifizieren sollten. Dafür wurden in einem Alignment sieben verschiedene Histidin-Kinasen und Histidin-Kinase-ähnliche Proteine aus *A. thaliana* und *Z. mays* verglichen. Die cDNA-Bank aus dem Hypokotyl 7 Tage alter etiolierter Kürbiskeimlinge wurde mit unterschiedlichen Kombinationen der degenerierten Primer durchsucht. Als Ausgangsmaterial für das 'Screening' diente eine Plasmid-Präparation mit dem 'QIAgen Plasmid Midi Kit' (Abschnitt 2.4.3) der Fraktion 4 der cDNA-Bibliothek. 100ng dieser Präparation wurde in einer verschachtelten ('nested') PCR (Abschnitt 2.6.3) als Template eingesetzt. Parallel wurde 100ng leeres pB-SK(-) als Template zur Kontrolle eingesetzt. Die 'nested' PCR wurde mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen durchgeführt (45, 50 und 55°C), da degenerierte Primer immer einen großen  $T_m$ -Bereich aufweisen, der auf dem Degenerationsgrad beruht.

## 2.9 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

Ein PCR-Produkt von 621bp Größe, das durch dieses Screening identifiziert worden war, wurde direkt kloniert und sequenziert, um sequenzspezifische Primer herstellen zu können. Dafür wurde eine 'nested' PCR mit den Primerkombinationen 2KR-F3/2KR-R2 in der äußeren und 2KR-F3/2KR-R1 in der inneren PCR durchgeführt (Abschnitte 2.6.3). Da die Klonierung eines PCR-Fragmentes allerdings eine größere Menge des PCR-Produktes erforderte, als mit den analytischen Reaktionen amplifiziert werden konnte, wurde ein präparativer 100 $\mu$ l-Ansatz durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde auf 1% Agarose aufgetrennt, die 621bp-Bande ausgeschnitten und mit dem 'E.Z.N.A. Gel Extraction Kit' aufgereinigt (Abschnitte 2.3.4 und 2.4.5). 2 $\mu$ l des aufgereinigten PCR-Produktes (ca. 160ng) wurde mit Hilfe des 'TOPO TA Cloning Kits' in den Vektor pCR2.1-TOPO ligiert und anschließend transformiert (Abschnitt 2.5.4).

### 2.9.2 PCR-basiertes 'Screening' mit genspezifischen Primern

Auf der Sequenz des Klons 4 basierend, der ein 621bp großes Fragment eines *CRE1/AHK4*-homologen Gens enthält, wurden die beiden genspezifischen Primer CRE1-forward und CRE1-reverse entwickelt, die für alle Runden des PCR-basierten 'Screenings' eingesetzt wurden (Anhang C). Durch die Verwendung von Primern, die spezifisch an dem *CRE1/AHK*-Homologen binden, wurde das Durchsuchen der cDNA-Bank zunächst auf dieses eine Gen beschränkt. Als Ausgangsmaterial für das PCR-basierte 'Screening' dienten zwei Proben mit jeweils 10 000 cfu, in denen das 621bp-Fragment mit den degenerierten Primern nachgewiesen werden konnte. Ausgehend von den Glycerin-Stammkulturen dieser beiden Proben 4-12 und 4-20 wurden Übernachtskulturen in 20ml LB angesetzt, indem sie mit jeweils 10 $\mu$ l der aufgetauten Stammkulturen angeimpft wurden (Abschnitt 2.2.2). Wurde in einer 'Screening'-Runde ein PCR-Signal identifiziert, so wurde die Glycerin-Stammkultur der verwendeten Fraktion der cDNA-Bank quantifiziert (Abschnitt 2.8.4), aufgeteilt und somit die Anzahl der verschiedenen Klone pro Ansatz reduziert. In jeder 'Screening'-Runde wurden Glycerin-Stammkulturen von den Übernachtskulturen als Ausgangsmaterial für die nächste Runde hergestellt. Aus je 1,5ml Übernachtskultur wurde Plasmid-DNA mittels 'Wizard Plus Miniprep Kit' (Abschnitt 2.4.3) isoliert und 100ng als Template für die PCR eingesetzt (Abschnitt 2.6).

## 2 Material und Methoden

Zunächst wurde die Probe 4-20 für die zweite 'Screening'-Runde ausgewählt und weiter aufgeteilt. Dafür wurde die Stammkultur quantifiziert (Abschnitt 2.8.4) und anschließend 20 Übernachtskulturen (je 10ml) mit je 2 000 cfu angeimpft (4.20-1 bis 4.20-20). Wie in der ersten Runde wurden die Plasmide mittels Mini-Präparation isoliert und je 100ng für eine PCR mit den genspezifischen Primern eingesetzt. Die Anzucht der Kolonien für die dritte 'Screening'-Runde erfolgte nicht in Flüssigmedien, sondern auf X-Gal-Platten, da in mehreren vorangegangenen Anläufen deutlich geworden war, dass sich die PCR-Signale nicht weiter verfolgen ließen, wenn die Flüssigkulturen mit zu wenig Ausgangsmaterial angeimpft wurden. Auf den Platten konnten auch langsamer wachsende Klone besser gedeihen. Die Stammkultur 4.20-5 wurde quantifiziert und soweit herunterverdünnt, dass mit 100 $\mu$ l jeweils 400 cfu auf 20 X-Gal-Platten (4.20.5-1 bis 4.20.5-20) ausplattiert wurden. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Kolonien mit 1,5ml LB-Medium pro Platte resuspendiert. 415 $\mu$ l der Suspension wurden für die Glycerin-Stammkultur verwendet, der Rest für die Mini-Präparation der Plasmide. 100ng der Plasmide stellten wiederum das Template für die PCR dar.

Für die weitere Aufteilung wurde Probe 4.20.5-8 ausgewählt, quantifiziert und soweit verdünnt, dass etwa 800 Kolonien verteilt auf 10 X-Gal-Platten ausplattiert wurden. 325 weiße Kolonien wurden mit einem Holzstäbchen gepickt und mit einer Schablone auf Masterplatten ausgestrichen, so dass jeder Kolonie eine Nummer zugeordnet war. Um möglichst viele Kolonien in der PCR analysieren zu können, wurden die Klone zu Gruppen zusammengefasst. Koloniematerial von je 20 Klonen wurde mit einem Holzstäbchen gepickt und mitsamt diesem Holzstäbchen in 10ml LB-Medium mit Carbenicillin über Nacht inkubiert. Aus den Übernachtskulturen wurden die Plasmide isoliert und je 10ng für die vierte 'Screening'-Runde eingesetzt. Für die fünfte 'Screening'-Runde wurden die Einzelklone direkt von der Masterplatte gepickt und das Koloniematerial als Template für ein PCR-Kolonie-'Screening' eingesetzt (Abschnitt 2.6.1).

### 2.9.3 Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde

Die Untersuchung der cDNA-Bibliothek mittels Hybridisierung diente der gleichzeitigen Analyse großer Mengen unabhängiger Klone nach einer bekannten Gensequenz mit einer komplementären DNA-Sonde. Während das PCR-basierte 'Screening' nur zu der Isolierung



## 2.9 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

Die Identifizierung eines einzelnen Klonen führte, war es möglich, durch die Hybridisierung mehrere Kolonien parallel zu identifizieren. Zur Visualisierung wurde die Sonde mit Digoxigenin (DIG) markiert und dieses DIG mit einem Anti-Digoxigenin-AP (Alkaline Phosphatase) Antikörper detektiert. Abschließend wurden die Substrate Nitroblue Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-p-Toluidinsalz (BCIP) in einer chromogenischen Enzymreaktion von der Alkalinen Phosphatase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Herstellung der DIG-markierten Sonde und die Hybridisierung wurde angelehnt an das 'DIG Application Manual for Filter Hybridization' von Roche durchgeführt. Für die Anzucht und den Transfer der Bakterienkolonien auf Nylon-Membranen dienten SAMBROOK U. RUSSEL (2001) als Grundlage.

### 2.9.3.1 Herstellen und Testen der DIG-markierten Sonde

Die Herstellung der DIG-markierten Sonde geschah mittels PCR unter Verwendung des 'DIG DNA Labeling Mix' von Roche. Als Template diente eine Midi-Präparation (Abschnitt 2.4.3) des Klons 4 (Tabelle 2.6), das mit den Primern CRE1-forward und CRE1-reverse (Anhang C) amplifiziert wurde und so eine Sonde von 323bp Größe erzeugte.

#### Präparativer PCR-Ansatz zur Herstellung DIG-markierter Sonden:

10x PCR-Puffer	10 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	6 $\mu$ l
10x DIG DNA Labeling Mix (Roche)	20 $\mu$ l
Forward Primer (100pmol/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
Reverse Primer (100pmol/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
DNA-Template (50pg/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 $\mu$ l
auf 2 PCR-Cups aufgeteilt (je 50 $\mu$ l)	

Parallel zu dem präparativen Ansatz wurden auch zwei Kontroll-PCRs mit unmarkierten dNTPs und 10 $\mu$ l Volumen durchgeführt. Einer der Kontrollansätze enthielt Plasmid-DNA als Template, der andere H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>. Die Ansätze wurden wie in Abschnitt 2.6 beschrieben pipettiert und mit dem DIG-PCR-Programm amplifiziert (Anhang B). Jeweils 2 $\mu$ l der Ansätze wurden auf einem Agarosegel analysiert (Abschnitt 2.3.4) und die restliche DIG-Sonde in Aliquots bei -20°C eingefroren. Das Agarosegel gab Auskunft über die Effizienz der PCR und der Markierung (Abbildung 2.1). Die ähnlich intensive Färbung

## 2 Material und Methoden

der DIG-markierten Proben (1 und 2) sowie der nicht markierten Probe (3) deutete auf eine gute Effizienz der PCR hin. Die Dichte der Markierung wurde über einen Größenunterschied im Gel sichtbar, da die Präsenz des DIG in der DNA zu einem verlangsamten Wanderungsverhalten in der Agarose führte.

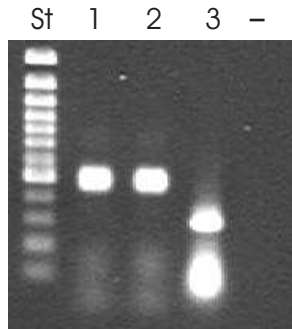


Abbildung 2.1: Effizienz der DIG-Markierung.

**St:** 100bp-Std; **1 und 2:** DIG-markierte Proben; **3:** unmarkierte Probe; **-** : Negativkontrolle ohne Template.

Zum Testen wurde die DIG-markierte DNA-Sonde aus der ungereinigten PCR in Zehnerschritten verdünnt und jeweils  $1\mu\text{l}$  als Punkt auf einer Nylon-Membran (Hybond-N+, Amersham-Pharmacia) aufgetragen. Durch diesen 'Dot-Blot' wurde nicht nur die Intensität der DIG-Markierung in der PCR getestet, sondern auch, ob die Fixierung der DNA an die Membran, die Antikörper- und Färbereaktion zu ausreichend gut sichtbaren Signalen führten. Die DNA wurde im Cross-Linker (Bio-Link BLX-254 – Vilber Lourmat) an die Membran fixiert, indem diese eine Minute lang unter folgenden Bedingungen mit UV-Licht (254nm, monochromatisch) bestrahlt wurde:  $120\text{mJ}/\text{cm}^2$  in 15cm Entfernung. Anschließend wurde sie zweimal 2min mit je 20ml Waschpuffer gewaschen. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur mit 60U/min geschwenkt. Durch eine 30-minütige Inkubation in 1%iger Blocklösung wurden potenzielle unspezifische Bindungs-

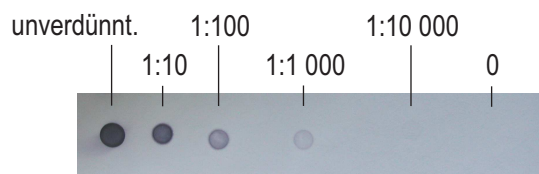


Abbildung 2.2: Überprüfung der DIG-markierten Sonde im Dot-Blot.

Je  $1\mu\text{l}$  der unaufgereinigten PCR wurde, in Zehnerschritten verdünnt, bis zu einer Verdünnung von 1:10 000 auf eine Nylon-Membran aufgetragen. 0 =  $1\mu\text{l}$  unmarkierte Kontroll-DNA.

## *2.9 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek*

stellen für den Anti-DIG-AP Antikörper blockiert. Die nachfolgende Antikörperbindung an die Digoxigenase erfolgte, indem die Membran eine halbe Stunde in 1% Blocklösung geschwenkt wurde, die zuvor im Verhältnis 1:10 000 mit der Antikörperstammlösung vermischt worden war. Die Membran wurde zweimal 15min mit je 20ml Waschpuffer gewaschen und danach 3min lang mit 10ml Detektionspuffer äquilibriert. Dieser wurde anschließend gegen 10ml Färbelösung ausgetauscht (10ml Detektionspuffer mit 34 $\mu$ l NBT und 35 $\mu$ l BCIP vermischt), worin die Membran im Dunkeln und ohne Schwenken 10 bis 20min inkubierte. Hatte die Färbung die erwünschte Intensität erreicht, wurde die Enzymreaktion durch fünfminütiges Schwenken in 20ml TE-Puffer abgestoppt. Die DNA-Lösung war bis zu einer Verdünnung von 1:1 000 noch sehr gut auf der Nylon-Membran zu erkennen (Abbildung 2.2). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von der markierten Probe eine Standardmenge von 1 $\mu$ l pro ml Hybridisierungspuffer eingesetzt.

### **2.9.3.2 Hybridisierung von Bakterienkolonien**

Während der gesamten Prozedur des Kolonie-'Screenings' wurden die verwendeten Nylon-Membranen (Hybond-N+, Amersham-Pharmacia) nur mit sterilisierten Pinzetten angefasst. Soweit nicht anders angegeben, wurden die einzelnen Lösungen auf Whatman-3MM Papier in 90mm-Petrischalen gegeben und die Membranen zur Inkubation luftblasenfrei daraufgelegt. Alle Schritte ohne Temperaturbezeichnung fanden bei Raumtemperatur statt.

### **Anzucht und Transfer der Kolonien auf Nylon-Membranen**

LB-Carbenicillin-Agarplatten wurden mit 2 000 bis 3 000 Kolonien einer quantifizierten Stammkultur (Abschnitt 2.8.4) angeimpft und max. 16h bei 37°C inkubiert, da kleine Kolonien (ca. 1mm im Durchmesser) schärfere Hybridisierungssignale erzeugen (SAMBROOK U. RUSSEL 2001). Anschließend wurden diese Originalplatten für mehrere Stunden bei 4°C gelagert, um den Kolonietransfer auf die Nylon-Membran zu erleichtern. Die Membranen wurden im Vorfeld markiert und in Aluminiumfolie eingeschlagen autoklaviert. Eine trockene, sterile Nylon-Membran wurde mit der Markierung nach unten auf die LB-Originalplatte gelegt. Dort verblieb sie in Kontakt mit den Bakterienkolonien, bis sie vollständig durchfeuchtet war. Um die Position des Filters relativ zur Platte zu bestimmen, wurden beide an drei asymmetrischen Stellen mit einer Kanüle durchstoßen.

## 2 Material und Methoden

Anschließend wurde die Membran mit einer einzigen vorsichtigen Bewegung wieder abgezogen. Die Originalplatten wurden nochmals für 6 bis 16h bei 37°C inkubiert, um die abgeklatschten Kolonien nachwachsen zu lassen und anschließend bei 4°C gelagert.

### Lyse der Kolonien und Binden der DNA an die Nylon-Membranen

Um die Bakterienkolonien auf einer Nylon-Membran zu lysieren, wurde sie nacheinander auf Whatman-Papier mit verschiedenen Lösungen inkubiert (Tabelle 2.8). Dabei zeigte die Seite mit den Kolonien nach oben. Bei dem Übertragen von einer Lösung in die nächste wurde überschüssige Flüssigkeit von der Unterseite der Membranen sorgfältig an den Rändern der Petrischalen abgestreift. Nach der abschließenden zehnminütigen Inkubation in 2x SSC wurden die Membranen mit dem 2x SSC-getränkten Whatman-Papier in den 'Cross-Linker' (Bio-Link BLX-254) gelegt, und so die freigesetzte DNA aus den lysierten Bakterienzellen an der Struktur der Nylon-Membran fixiert (Abschnitt 2.9.3.1).

Tabelle 2.8: Die Lyse von Bakterienkolonien auf der Nylon-Membran.

Die Membranen wurden in der angegebenen Reihenfolge für die entsprechende Zeit in den einzelnen Lösungen inkubiert.

	<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>	<b>Dauer</b>
1.	10% SDS	2,5ml	3min
2.	Denaturierungslösung	2,5ml	15min
3.	Trocknen auf Küchenpapier	–	1min
4.	Neutralisierungslösung	2,5ml	15min
5.	Trocknen auf Küchenpapier	–	1min
6.	2x SSC	2,5ml	10min

Um die Membranen von störenden Zellrückständen zu befreien, schloss sich eine Behandlung mit Proteinase K an. Für die Behandlung einer Membran wurden 50 $\mu$ l Proteinase K (600U/ml, 15mg/ml) mit 450 $\mu$ l 2x SSC vermischt und gleichmäßig auf einer Aluminiumscheibe in einer Petrischale verteilt. Die Membran wurde mit dem Koloniematerial nach oben in die Lösung gelegt und die Petrischale verschlossen 1h bei 37°C inkubiert. Zum Waschen wurde Whatman-Papier mit 2ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> getränkt und die Membran mit dem Zellmaterial nach unten daraufgelegt. Sie wurde vorsichtig hin und her bewegt

## 2.9 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

und anschließend wieder abgezogen. Dieser Waschschrift wurde so lange wiederholt, bis keine Zellrückstände mehr an der Nylon-Membran zu erkennen waren. Die Membranen wurden etwa 3min luftgetrocknet und anschließend hybridisiert.

### 10% SDS:

10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst

### 2x SSC:

0,3M NaCl  
0,03M Na-Citrat  
pH 7,0 mit NaOH eingestellt

### Denaturierungspuffer:

0,5M NaOH  
1,5M NaCl  
1 Spatelspitze Lysozym

### Neutralisierungspuffer:

0,5M Tris-HCl, pH 7,5  
1,5M NaCl

## Hybridisierung und Waschen der Nylon-Membran

Die trockenen Nylon-Membranen wurden immer zu zweit mit der DNA-tragenden Seite nach außen in einem Hybridisierungsbeutel platziert. Nach Zugabe von 10ml Hybridisierungspuffer wurde der Beutel mit einer Vacuiermaschine (Krups) luftblasenfrei verschweißt und flach für 1h in einem vorgewärmten Wasserbad bei 65°C und 100U/min inkubiert. Kurz vor Ablauf der Zeit wurde die DIG-markierte Sonde (Abschnitt 2.9.3.1) vorbereitet. Zur Trennung der Einzelstränge wurden 10 $\mu\text{l}$  der Sonde mit 90 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  in einem PCR-Gefäß vermischt und 5min bei 95°C im Thermocycler inkubiert. Die DNA wurde durch kurzes Anzentrifugieren (Biofuge pico) am Boden des Gefäßes gesammelt und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert. Der Hybridisierungsbeutel wurde aufgeschnitten, und die Sonde zu dem Hybridisierungspuffer gegeben (Endkonzentration = 1 $\mu\text{l}$  Sonde/ml Puffer). Eventuelle Luftblasen wurden herausgedrückt und der Beutel wieder verschweißt. Daran schloss sich eine 16-stündige Inkubation bei 65°C und 100U/min im Wasserbad an. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wurde zwei- bis dreimal verwendet und in der Zwischenzeit bei -20°C gelagert.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen aus dem Hybridisierungsbeutel in einen sterilen Behälter mit 100ml Low Stringency Buffer gegeben, so dass sie frei darin schwammen. Bis zu zehn Membranen wurden auf diese Weise in einem Behälter leicht bewegt (80U/min). Nach 5min wurde der Puffer gegen 100ml neuen Low Stringency Buffer ausgetauscht und erneut 5min gewaschen. Es schlossen sich zwei fünfzehnminütige Wasch-

## 2 Material und Methoden

schritte mit je 100ml vorgewärmtem High Stringency Buffer an, die im Wasserbad bei 65°C und 80U/min durchgeführt wurden. Darauf folgte ein letzter Schritt mit 100ml Waschpuffer bei Raumtemperatur (2min, 80U/min). Mit diesen Waschschritten wurde nicht oder unspezifisch gebundene DIG-markierte Sonde von der Membran entfernt, was maßgeblich dazu beitrug, den Untergrund bei der nachfolgenden Antikörperdetektion zu reduzieren.

### Hybridisierungspuffer:

5x	SSC
0,1% (w/v)	SDS
5%	Dextransulfat
5%	Blockier-Stammlösung

### 10% Blockier-Stammlösung:

10%	Blocking Reagenz (Roche) in Maleinsäurepuffer
-----	--

### Low Stringency Buffer:

2x	SSC
0,1%	SDS

### High Stringency Buffer:

0,1x	SSC
0,1%	SDS

### Waschpuffer:

0,3%	Tween 20
in Maleinsäurepuffer	

### Maleinsäurepuffer:

100mM	Maleinsäure
150mM	NaCl
pH 7,5 mit NaOH eingestellt	

## Detektion der hybridisierten Proben

Nach der Hybridisierung der Proben mit DIG-markierter Sonde wurde die Sonde mittels Anti-DIG-AP-Antikörper detektiert. Dafür wurden die Membranen als erstes mit 20ml 1%iger Blockierlösung inkubiert. So wurden mögliche unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper blockiert, was die Hintergrundfärbung erheblich reduzierte. Nach einer Stunde bei leichter Bewegung (60U/min) wurde die Blockierlösung durch 10ml Antikörperlösung ersetzt und der Ansatz eine weitere Stunde bei 60U/min geschwenkt. Zur Herstellung der Antikörperlösung wurde 1%ige Blocklösung mit Antikörper (AP Fab fragments (0,75U/ $\mu$ l), Roche) im Verhältnis 1:5 000 vermischt. Die Antikörperlösung konnte zwei- bis dreimal verwendet werden und wurde bis zu zwei Wochen bei 4°C gelagert. Nachfolgend wurden die Membranen zweimal mit je 100ml Waschpuffer gewaschen (je 15min bei Raunt. und 100U/min). Für die chromogenische Reaktion äquilibrierte jede Membran bei Raumtemperatur einzeln für 2min und 60U/min in 20ml Detektionspuf-

## 2.9 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

fer. Dieser wurde anschließend gegen 10ml Färbelösung ausgetauscht, welche aus 10ml Detektionspuffer mit 34 $\mu$ l NBT und 35 $\mu$ l BCIP bestand. Darin inkubierte die Membran im Dunkeln und ohne Schwenken 20 bis 40min. Hatte die Färbung die erwünschte Intensität erreicht, wurde die Enzymreaktion durch fünfminütiges Schwenken in 20ml TE-Puffer abgestoppt. Die Membranen wurden anschließend getrocknet und in Aluminiumfolie eingeschlagen gelagert.

### 1% Blockierlösung:

10%    Blockier-Stammlösung  
      in Maleinsäurepuffer

### 10x Detektionspuffer:

1M    Tris/HCl (pH 9,5)  
1M    NaCl

### TE-Puffer:

10mM    Tris/HCl (pH 8,0)  
1mM    EDTA

### 2.9.3.3 'Screening' der cDNA-Bibliothek mittels Hybridisierung

Für die ersten drei 'Screening'-Runden wurde mit der Stammkultur der Probe 4-20 als Ausgangsmaterial gearbeitet, da in dieser Probe sowohl mit degenerierten als auch mit genspezifischen Primern in der PCR DNA-Fragmente amplifiziert worden waren. Die Glycerin-Stammkultur der Probe 4-20 mit etwa 10 000 cfu wurde für das 'Screening' amplifiziert und aufgeteilt. Es wurden etwa 2 000 cfu pro Probe auf LB-Platten mit Carbenicillin ausplattiert. In weiteren drei 'Screening'-Runden wurde die Untersuchung mittels Hybridisierung auf die gesamte cDNA-Bank-Fraktion 4 ausgedehnt und dabei etwa 3 000 cfu pro Platte ausplattiert. Als Positivkontrolle wurde auf jede Platte mit einem Holzstäbchen etwas Koloniematerial aus der Glycerin-Stammkultur des Klons 4 (Tabelle 2.6) an eine markierte Position gepunktet. So ließ sich erkennen, ob die Hybridisierung an sich funktioniert hatte, wenn keine weiteren Signale auf den Platten zu erkennen waren. War an der Position der DIG-Färbung auf der Originalplatte keine eindeutige Einzelkolonie zu sehen, wurde etwas Koloniematerial aus dieser Region entnommen, in 100 $\mu$ l

## 2 Material und Methoden

LB-Medium resuspendiert und erneut auf einer LB-Agarplatte (+ Carbenicillin) ausplattiert. Diese Platte wurde dann ebenfalls mittels Hybridisierung analysiert und nach einer Stunde Färben fotografiert (Abschnitt 2.9.3.2).

### 2.9.4 Überprüfung der isolierten Klone

Die isolierten Klone aus dem PCR-basierten 'Screening' und der Untersuchung mit DIG-markierter Sonde wurden mit PCR und Restriktionsverdau auf ihre Ähnlichkeit zu Klon 4 überprüft. Die beiden Einzelklone 207 und 276 (Abschnitt 2.9.2) wurden auf LB-Platten mit Carbenicillin vereinzelt und das Koloniematerial mit M13-Primern für ein PCR-Kolonie-'Screening' eingesetzt (Abschnitt 2.6.1). Die mit der Hybridisierung identifizierten Klone (Abschnitt 2.9.3) wurden auf X-Gal-Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Die weißen Kolonien wurden ebenfalls in einem PCR-Kolonie-'Screening' mit den genspezifischen Primern CRE1-forward und CRE1-reverse auf ihre Identität und mit den plasmidspezifischen M13-Primern auf ihre Größe untersucht (Abschnitt 3.2.4). Die Klone 276 und H1 wurden jeweils als Übernachtskultur in 10ml LB + Carbenicillin angezogen (Abschnitt 2.2.2). Daraus wurden Glycerin-Stammkulturen angesetzt und Plasmide mittels 'Wizard Plus Miniprep Kit' isoliert (Abschnitt 2.4.3). Zur weiteren Untersuchung ihrer Ähnlichkeit zu dem Klon 4 wurden sie einem Restriktionsdoppelverdau mit den beiden Enzymen *EcoRI* und *BamHI* unterzogen (Abschnitt 2.5.2).

## 2.10 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR

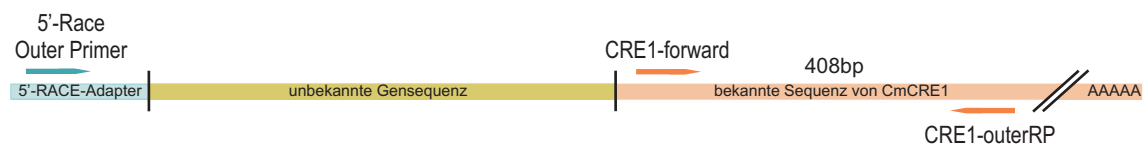
Bei RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) handelt es sich um eine PCR-Technik, die die Klonierung von vollständigen cDNA-Sequenzen ermöglicht, obwohl nur ein Teil der Sequenz zur Verfügung steht. Im Fall dieser Arbeit fehlte das 5'-Ende des betrachteten Gens *CmCRE1*. Für die Durchführung der 5'RACE-PCR wurde mit dem 'FirstChoice RLM-RACE Kit' von Ambion gearbeitet. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die RACE-PCR wurde mit zwei Proben aus Kürbis parallel durchgeführt. Es wurde Gesamt-RNA aus dem Spross 5 Tage alter Keimlinge



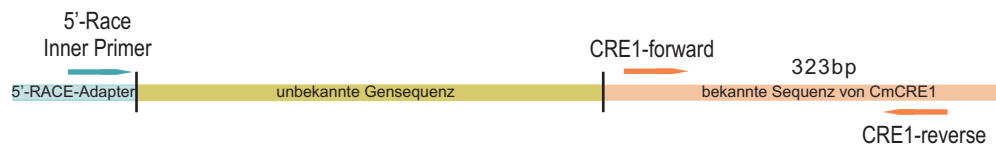
## 2.10 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR

und aus den Kotyledonen 7 Tage alter Keimlinge verwendet (Ernten 2 und 3 im Anhang A). Anzucht und Ernte erfolgte wie in Abschnitt 2.1 beschrieben. Die verwendeten Primer wurden so entwickelt, dass sie einerseits möglichst wenig des bekannten Genfragments umschlossen, denn es sollte ja möglichst effizient der unbekannte Teil amplifiziert werden, und andererseits noch weit genug auseinander lagen, um die entstehenden DNA-Fragmente anhand ihrer Größe eindeutig unterscheiden zu können. In Abbildung 2.3 sind die Annealingbereiche der Primer und die zu erwartenden PCR-Produkte schematisch dargestellt.

### A Äußere RACE-PCR



### B Innere RACE-PCR



### C Kontroll-PCR



Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der 'nested' PCR zur Amplifizierung des CmCRE1-3'-Endes.

**(A)** Äußere RACE-PCR: Das RACE-Produkt wird mit dem 5'-RACE Outer Primer und CRE1-outerRP umschlossen; mit dem genspezifischen Kontroll-Primer CRE1-forward wird ein 408bp großes Fragment amplifiziert. **(B)** Innere RACE-PCR: 5'-RACE Inner Primer und CRE1-reverse umschließen das RACE-Produkt; mit CRE1-forward wird ein 323bp großes Fragment amplifiziert. **(C)** Kontroll-PCR mit genspezifischen Primern: Das RACE-Produkt aus der inneren PCR wird mit den genspezifischen Primern CRE1-forw2 und CRE1-kontrollRP auf das Vorhandensein des gesuchten Gens überprüft (268bp).

### 2.10.1 Amplifizierung der RACE-Produkte

In der sogenannten 'RNA Ligase Mediated' (RLM)-RACE PCR wird die Template-RNA vor der Reversen Transkriptase Reaktion zum Umschreiben in cDNA enzymatisch modifiziert, um die Effizienz und Verlässlichkeit der anschliessenden PCR zu steigern. 10  $\mu$ g Gesamt-RNA (Abschnitt 2.4.1) wurden zunächst einer Behandlung mit Alkaliner Phosphatase (CIAP) unterzogen, die die 5'-Phosphatreste von fragmentierter RNA, rRNA, tRNA oder kontaminierender DNA entfernte. Nur vollständige, durch eine sogenannte 'Cap-Struktur' geschützte mRNA wurde von der Reaktion ausgenommen. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen und wurde 1h im Thermocycler bei 37°C inkubiert.

#### Entfernung von 5'-Phosphaten mit CIAP:

10 $\mu$ g Gesamt-RNA	x $\mu$ l
10x CIAP-Puffer	2 $\mu$ l
Alkaline Phosphatase	2 $\mu$ l
nukleasefreies Wasser	ad 20 $\mu$ l

Der Ansatz wurde mit 15  $\mu$ l Ammoniumacetat-Lösung versetzt, mit nukleasefreiem Wasser auf 150  $\mu$ l aufgefüllt und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt (Abschnitt 2.3.1), um die Phosphatase vollständig aus dem Ansatz zu entfernen. Eine abschließende Extraktion mit 150  $\mu$ l Chloroform diente der Entfernung eventuell vorhandener Phenolreste. Zum Aufkonzentrieren der RNA wurde die Probe mit Isopropanol gefällt. Abweichend von Abschnitt 2.3.2 war das Salz schon vor der Phenol/Chloroform-Extraktion zugegeben worden und die Probe inkubierte mit dem Alkohol 10min auf Eis. Das 70%ige EtOH zum Waschen des Pellets hatte Raumtemperatur. Das Pellet wurde in 11  $\mu$ l nukleasefreiem Wasser resuspendiert und direkt für die nachfolgende Behandlung mit 'Tobacco Acid Pyrophosphatase' (TAP) verwendet. Die Pyrophosphatase entfernte die 'Cap-Struktur' von den 5'-Enden der vollständigen mRNA-Moleküle und machte einen 5'-Phosphatrest zugänglich für die nachfolgende Ligation des 5'-RACE-Adapters. An den dephosphorylierten unerwünschten RNA-Molekülen aus der CIP-Reaktion konnte keine Ligation stattfinden. Zur Entfernung der 'CAP-Struktur' wurde die CIP-behandelte RNA wie unten beschrieben, zusammengestellt und 1h bei 37°C im Thermocycler inkubiert.

## 2.10 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR

### Entfernung der 'Cap-Struktur' mit TAP:

CIAP-behandelte RNA	5 $\mu$ l
10x TAP-Puffer	1 $\mu$ l
Tobacco Acid Pyrophosphatase	2 $\mu$ l
nukleasefreies Wasser	ad 10 $\mu$ l

2 $\mu$ l dieses TAP-Ansatzes wurde anschließend direkt für die Ligation der 5'-RACE Adapter eingesetzt. Die Ligation inkubierte ebenfalls 1h bei 37°C im Thermocycler.

### Ligation der 5'-RACE Adapter:

CIP/TAP-behandelte RNA	2 $\mu$ l
5'RACE Adapter	1 $\mu$ l
10x RNA-Ligase Puffer	1 $\mu$ l
T4 RNA-Ligase (2,5U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
nukleasefreies Wasser	ad 10 $\mu$ l

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, können einzelsträngige cDNA-Moleküle synthetisiert werden, die komplementär zur Template-RNA sind (Abschnitt 2.12.2). Zur Umwandlung der enzymatisch veränderten RNA in cDNA wurde der spezifische RT-Primer CRE1-RT2 (Anhang C) verwendet, der basierend auf der Sequenz des Klons 276 (Anhang D) entwickelt wurde. Der Ansatz für die Reverse Transkription wurde wie unten angegeben zusammengestellt, wobei der ungeereinigte Ligationsansatz als Template diente. Die RT-Reaktion wurde 2h bei 45°C im Thermocycler inkubiert und anschließend aliquotiert bei -70°C gelagert.

### Reverse Transkription:

ligierte RNA	2 $\mu$ l
dNTP-Mix (jeweils 2,5mM)	4 $\mu$ l
RT-Primer (CRE1-RT2, 10pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
10x RT-Puffer	2 $\mu$ l
RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
M-MLV Reverse Transkriptase	1 $\mu$ l
nukleasefreies Wasser	ad 20 $\mu$ l

Zur Amplifizierung der cDNA wurde eine 'nested' PCR durchgeführt. Dafür wurden sowohl in der äußeren als auch in der inneren PCR auf der einen Seite genspezifische Primer verwendet, die basierend auf der Sequenz des Klons 276 entwickelt worden waren (Anhang D) und auf der anderen Seite 5'RACE-Primer, die spezifisch für den ligierten Adapterarm waren (Bestandteil des Kits). Die äußere Reaktion der 'nested' PCR

## 2 Material und Methoden

wurde mit dem ungereinigten RT-Produkt als Template durchgeführt und setzte sich folgendermaßen zusammen.

### Äußere 5'RACE-PCR:

RT-Produkt	0,4 $\mu$ l
10x PCR-Puffer (incl. MgSO <sub>4</sub> , Ambion)	2 $\mu$ l
dNTP-Mix (jeweils 2,5mM, Ambion)	1,6 $\mu$ l
CRE1-outerRP (genspez. Primer, 10pmol/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
5'RACE Outer Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
nukleasefreies Wasser	ad 19 $\mu$ l

Der PCR-Ansatz wurde in den vorgeheizten Thermocycler gestellt (PCR-Programm in Anhang B). Die Polymerase (SuperTaq Plus, Ambion) wurde auf eine Konzentration von 0,6U/ $\mu$ l verdünnt und jeweils 1 $\mu$ l pro Probe in einem manuellen Hotstart zu der Probe gegeben. Parallel wurde eine Kontroll-PCR mit einem zweiten genspezifischen Primer (CRE1-forward; Anhang C) statt des adapterarmspezifischen 5'RACE Outer Primers durchgeführt.

### Innere 5'RACE-PCR:

Produkt der äußeren PCR	0,4 $\mu$ l
10x PCR-Puffer (incl. MgSO <sub>4</sub> , Ambion)	2 $\mu$ l
DMSO (100%)	0,4 $\mu$ l
dNTP-Mix (jeweils 2,5mM, Ambion)	1,6 $\mu$ l
CRE1-reverse (genspez. Primer, 10pmol/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
5'RACE Inner Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 $\mu$ l

Die innere PCR wurde mit 0,4 $\mu$ l des äußeren PCR-Ansatzes als Template angesetzt und wie oben beschrieben pipettiert. Die Amplifizierung erfolgte wie für die äußere PCR beschrieben. Auch hier wurde parallel eine Kontroll-PCR mit dem zweiten genspezifischen Primer CRE1-forward statt des adapterarmspezifischen 5'RACE Inner Primers durchgeführt. Das Produkt der inneren RACE-PCR wurde zur Kontrolle in einer dritten PCR (Abschnitt 2.6) noch einmal mit einem anderen Set genspezifischer Primer amplifiziert (CRE1-forw2/CRE1-kontrollRP; Abbildung 2.3 C). Nach Beendigung der Reaktionen wurden die amplifizierten Fragmente der auf 1,5%igen Agarosegelen überprüft (Abschnitt 2.3.4).

### 2.10.2 Isolierung und Klonierung der RACE-Produkte

Für die Isolierung der RACE-Produkte wurden verschiedene Parameter der inneren PCR optimiert. Das Template (das PCR-Produkt der äußeren RACE-PCR) wurde 1:100 verdünnt eingesetzt und die Annealingtemperatur auf 68°C hochgesetzt (PCR-Programm in Anhang B). Es wurde ein präparativer PCR-Ansatz mit einem Volumen von 100 µl angesetzt, der im gleichen Verhältnis wie in Abschnitt 2.10.1 zusammengesetzt war. In den fertig angesetzten Mastermix wurde 1 µl Template gegeben und die Reaktion mit einem manuellen Hotstart gestartet (Abschnitt 2.6). Die präparative innere PCR wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Die aufgetrennten Banden wurden einzeln ausgeschnitten und mittels 'QIAquick Gel Extraction Kit' aufgereinigt (Abschnitt 2.4.5). Anschließend erfolgte eine Klonierung der aufgereinigten PCR-Fragmente mit dem 'TOPO TA Cloning Kit' (Abschnitt 2.5.4). Die TOPO-Ligationsansätze wurden mittels Elektroporation in *E. coli* XL10-Gold transformiert (Abschnitt 2.7.1), auf X-Gal-Platten ausplattiert und die weißen Kolonien mit den genspezifischen Primern CRE1-forw2 und CRE1-kontrollRP in einem PCR-Kolonie-'Screening' untersucht (Abschnitt 2.6).

### 2.10.3 Sequenz- und Strukturanalyse von *CmCRE1*

Die isolierten Klone 4, H1, 276, 3 und 11 (Tabelle 2.6) wurden mit M13-Primern und diversen genspezifischen Primern von beiden Seiten durchsequenziert. Sowohl die verwendeten Primer als auch die vollständige Sequenz des Gens *CmCRE1* sind im Anhang aufgeführt. Alle Sequenzierarbeiten wurden als 'Hot Shot'-Reaktionen von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt. Die Translation der Nukleotidsequenz in die sechs möglichen Aminosäure-Leserahmen erfolgte mit dem BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tcm.edu>). Der Homologievergleich der Aminosäuresequenz mit Protein-Datenbanken wurde mit der BLAST2-Suche auf der EMBL-Homepage durchgeführt (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2>). Alignments mit homologen Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW auf der Homepage des BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tcm.edu>) erzeugt und anschließend mit dem Programm Boxshade dargestellt (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade.html>). Mit der Blast-Software auf der NCBI-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurde eine Strukturanalyse der einzelnen Gendomänen von *CmCRE1* durchgeführt.

## 2.11 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

Für die funktionelle Expression von *CmCRE1* wurde ein Hefe-Komplementierungstest verwendet, der schon erfolgreich von INOUE ET AL. (2001) für den Funktionsnachweis von CRE1/AHK4 aus *A. thaliana* eingesetzt wurde. Die funktionelle Expression eines heterologen Gens in dem eingesetzten Hefe-Stamm *sln1Δ* erfordert das vollständige Gen vom Start- bis zum Stopcodon und dessen erfolgreiche Translation in ein voll funktionstüchtiges Protein. Daher wurde die Klonierung von *CmCRE1* in den Hefektor p413TEF vorgenommen (Tabelle 2.5), dessen Klonierungsregion auf dem pBluescript-Vektor (Stratagene) basiert. p413TEF verfügt über das Markergen HIS3 und verleiht Hefezellen damit die Fähigkeit, auf Histidin-defizientem Medium zu wachsen. Damit wurde hier die His-Defizienz der Hefemutante *sln1Δ* ausgeglichen und ermöglichte eine Selektion nach Hefezellen mit dem eintransformierten Vektor. Der TEF-Promotor entstammt dem TEF2-Gen ('translation elongation factor 1 $\alpha$ '; NAGASHIMA ET AL. 1986) und führt zu einem mittleren Expressionslevel (MUMBERG ET AL. 1995).

### 2.11.1 Klonierung von *CmCRE1* in den Hefektor p413TEF

Als Ausgangsmaterial zur Klonierung des vollständigen *CmCRE1*-Gens wurde 1 $\mu$ g mRNA aus den Kotyledonen 5 Tage alter unbehandelter Kürbiskeimlinge verwendet. Die mRNA wurde wie in Abschnitt 2.4.2 aus 2g Pflanzenmaterial isoliert (Ernte 4 in Anhang A) und in einer Reversen Transkriptase-Reaktion (20 $\mu$ l) mit dem RT-Primer CRE1-RT1 zu cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.12.2). 5 $\mu$ l des RT-Ansatzes wurde als Template für eine präparative PCR mit 200 $\mu$ l Volumen unter Verwendung von 5U 'SuperTaq Plus'-Polymerase von Ambion eingesetzt. Dafür wurde der Standard-PCR-Ansatz (Abschnitt 2.6) auf 200 $\mu$ l hochgerechnet und das PCR-Programm 'Klonierung' verwendet (Anhang B). Die verwendeten Primer basierten auf der Sequenz der Primer CRE1-FP0a und CRE1-RP0, wurden aber zusätzlich mit Restriktionsschnittstellen versehen. Der Forward-Primer enthielt eine *Xba*I-Schnittstelle und wurde CRE1-FP-Xba genannt. In den Reverse-Primer, CRE1-RP-Xho, wurde eine (*Xho*I-Schnittstelle) ein-

## 2.11 Funktionelle Expression von CmCRE1 im Hefe-Komplementierungstest

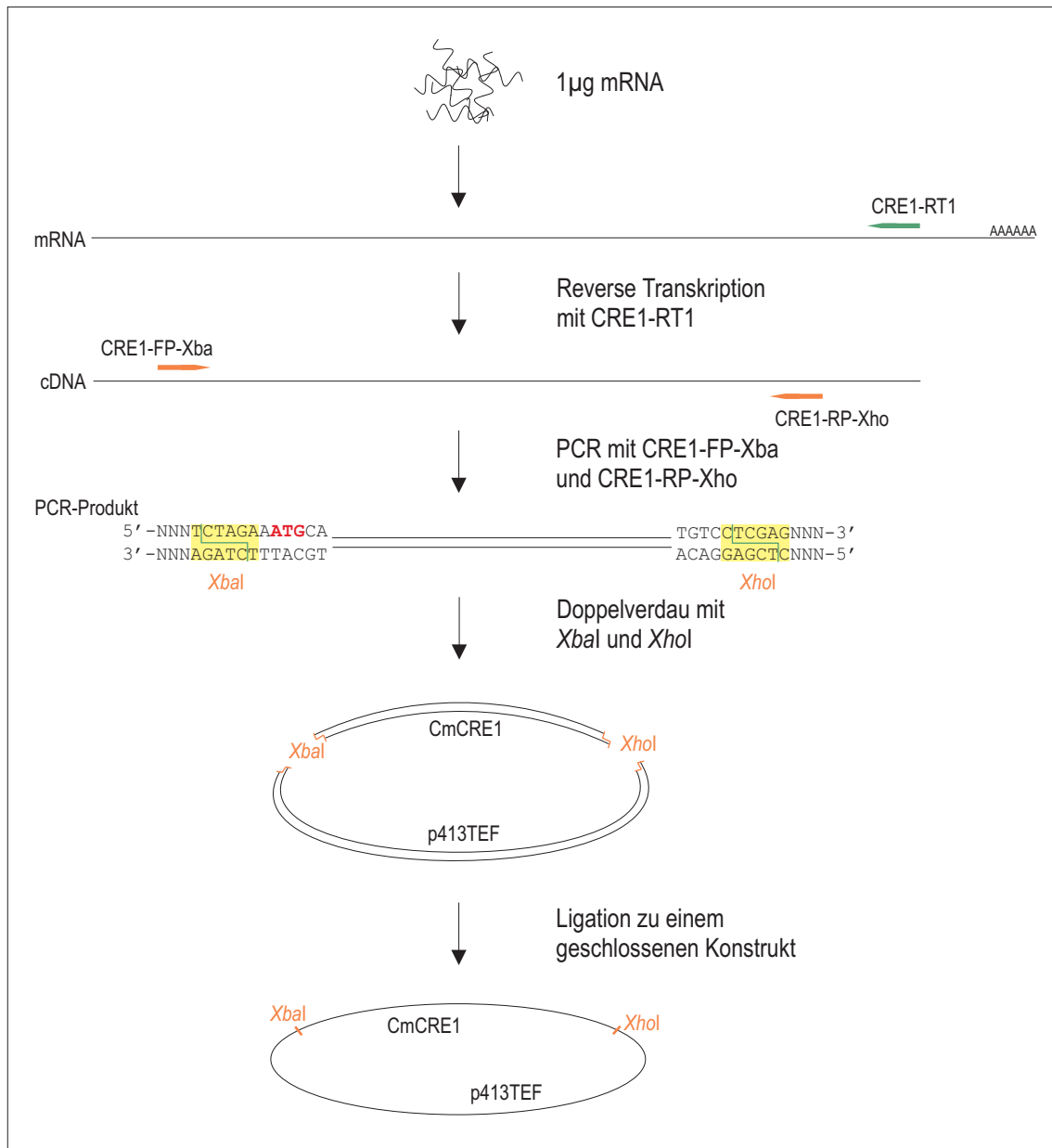


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der gerichteten Klonierung des Gens *CmCRE1* in den Vektor p413TEF über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *XhoI*.

gebaut. Bei der Wahl der Restriktionsschnittstellen wurde darauf geachtet, dass diese im Vektor möglichst weit voneinander entfernt lagen, da der Verdau von endständigen Schnittstellen sehr ineffizient verläuft. Aus dem gleichen Grund wurden an die Sequenz der Schnittstellen im Primer noch drei degenerierte Basen angehängt. Sie dienen der Effizienzsteigerung beim Verdau des mit den Primern amplifizierten PCR-Produktes.

## 2 Material und Methoden

Das PCR-Produkt wurde mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Isopropanol-Fällung aufgereinigt (Abschnitte 2.3.1 und 2.3.2) und die Konzentration photometrisch bestimmt (Abschnitt 2.3.3). Das Plasmid p413TEF wurde in *E. coli* HB10 1 (Referenz: ATCC) über Nacht in 2x 20ml LB-Medium (mit Carbenicillin) angezogen und mittels 'QIAgen Plasmid Midi Kit' isoliert (Abschnitt 2.4.3). Sowohl das Plasmid als auch das PCR-Produkt wurden in einem präparativen Ansatz mit je 40U der Enzyme *Xba*I und *Xho*I im Doppelverdau geschnitten (Abschnitt 2.5.2). Das geschnittene Plasmid wurde im Anschluss in dem Restriktionsansatz dephosphoryliert und die Proben auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.3.4). Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und mit dem 'QIAquick Gel Extraction Kit' aufgereinigt (Abschnitt 2.4.5). Es folgte die Ligation des geschnittenen PCR-Produktes in den geschnittenen und dephosphorylierten Vektor (Abschnitt 2.5.4). Der Ligationsansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert (Abschnitt 2.3.1) und mit Isopropanol gefällt (Abschnitt 2.3.2). Die aufgereinigte DNA wurde in 6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. 2  $\mu$ l wurden zur Überprüfung der Ligation auf ein Agarosegel aufgetragen und die restlichen 4  $\mu$ l vollständig für die Transformation des Ligationsproduktes in elektrokompente *E. coli* XL10-Gold-Zellen eingesetzt (Abschnitt 2.7.1). Der Transformationsansatz wurde vollständig auf LB-Platten mit Carbenicillin ausplattiert (200  $\mu$ l/Platte) und alle Einzelkolonien mit Nummerierung auf eine LB-Masterplatte mit Carbenicillin übertragen. Von diesen Masterplatten wurden die Kolonien direkt für ein PCR-Kolonie-'Screening' mit genspezifischen Primern eingesetzt (Abschnitt 2.6.1).

Für das Screening wurden jeweils 5 Kolonien in Gruppen vereinigt, indem Koloniematerial von der Masterplatte in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert, 5min aufgekocht und je 1  $\mu$ l als Template für eine PCR mit den Primern CRE1Seq-FP und CRE1Seq-RP verwendet wurde (Abbildung 2.5). Die in den positiven Gruppen enthaltenen Kolonien wurden in einem weiteren Kolonie-'Screening' mit derselben Primer-Kombination noch einmal einzeln untersucht. Positive Einzelkolonien wurden über Nacht in 10ml LB-Medium (+ Carbenicillin) angezogen. Aus diesen Übernachtskulturen wurden Glycerin-Stammkulturen gewonnen (Abschnitt 2.2.2) und Plasmide mittels 'Wizard Plus Miniprep Kit' extrahiert (Abschnitt 2.4.3). Die Plasmide wurden anschließend zur Überprüfung einem Restriktionsverdau mit den beiden Enzymen *Xba*I und *Xho*I unterzogen (Abschnitt 2.5.2), mit denen das Gen in den Vektor p413TEF inkloniert worden war.



## 2.11 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

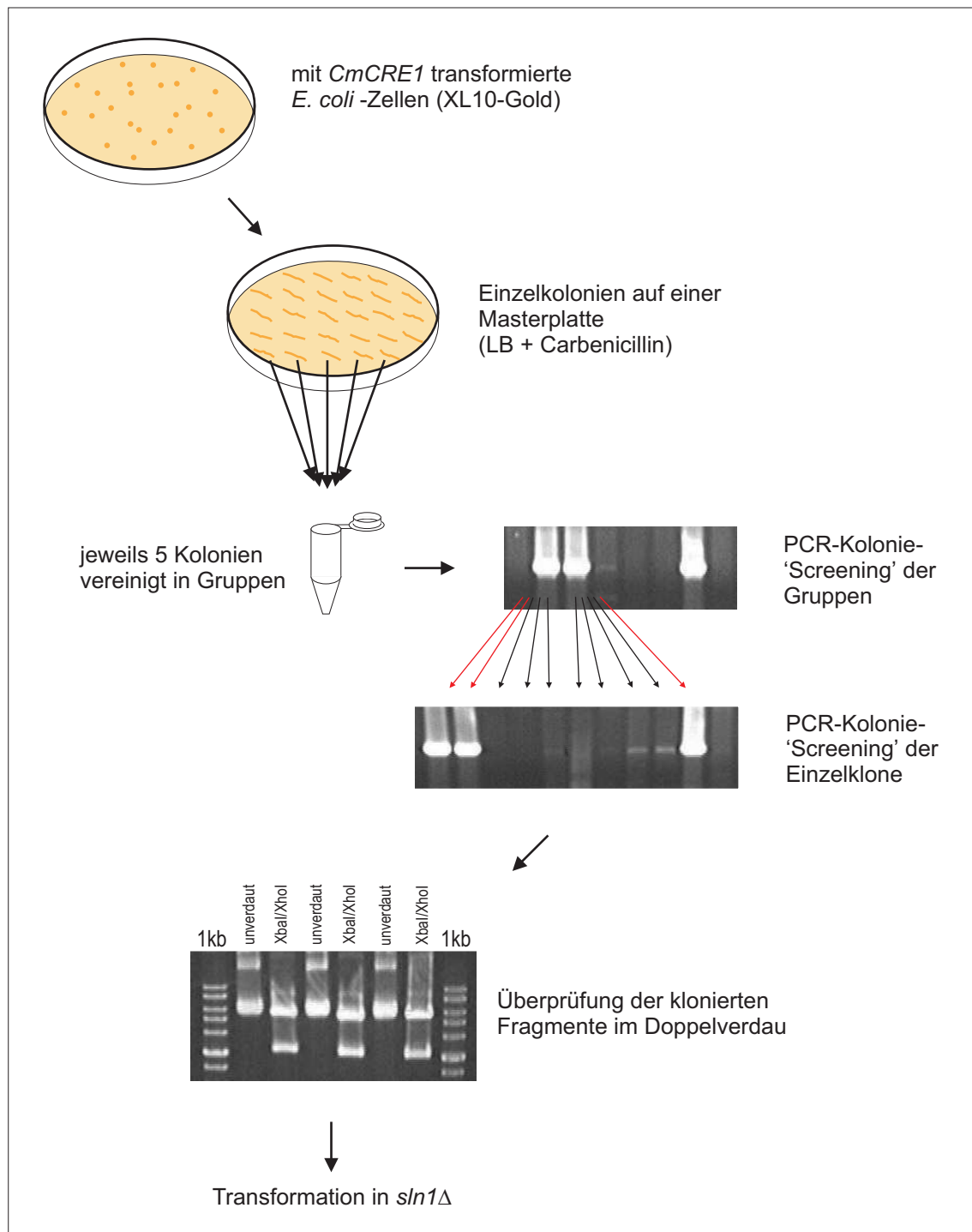


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Isolierung und Identifizierung von *E. coli*-Klonen mit *CmCRE1*.

### 2.11.2 Transformation in den Hefestamm *sln1Δ*

Sechs positiv getestete Konstrukte wurden für eine Hefetransformation vereinigt. Dafür wurden jeweils 1,7  $\mu\text{g}$  pro Plasmid verwendet, so dass sich eine Gesamtmenge von ungefähr 10  $\mu\text{g}$  ergab. Parallel zu den Transformationen mit den zu prüfenden Konstrukten wurde auch eine Transformation mit dem Sequenzhomologen *CRE1/AHK4* aus *A. thaliana* (in dem Vektor p413TEF) als Positivkontrolle durchgeführt. Die Transformationsansätze wurden auf Complete Minimal (CM-)Dropout-Medium mit Galactose oder Glucose, mit oder ohne *t*-Zeatin, ausplattiert (Abschnitte 2.2.1 und 2.7.2). Von dem Transformationsansatz AHK4 wurden 2x 200  $\mu\text{l}$  auf CM-Dropout-Medium mit Glucose und *t*-Zeatin ausplattiert. Der Transformationsansatz CmCRE1 wurde vollständig auf Glucoseplatten mit *t*-Zeatin ausplattiert (abzüglich der Kontrollen auf CM-Dropout-Medium mit Galactose oder Glucose ohne Hormon).

### 2.11.3 Charakterisierung von CmCRE1 mit verschiedenen Pflanzenhormonen

Zur Charakterisierung der erfolgreich transformierten Hefe-Klone wurden die Transformanten auf CM-Minimalmedien (ohne die Aminosäuren His, Trp und Ura) mit Glucose und unterschiedlichen Pflanzenhormonen ausgestrichen (Tabelle 2.2 und Abschnitt 2.2.1). Ein Klon mit dem Cytokininrezeptor *CRE1/AHK4* wurde zur Überprüfung immer mit ausgestrichen, um eventuelle Unterschiede von CmCRE1 zur Ligandenspezifität von *CRE1/AHK4* darzustellen.

### 2.11.4 Sequenz- und Strukturanalyse der transformierten Hefeklone

Die charakterisierten Klone CmCRE1-1 und CmCRE1-7 wurden im PCR-Kolonie-'Screening' mit den genspezifischen Primern *CRE1-FP0a* und *CRE1-RP0* sowie den plasmidspezifischen Primern *p413TEFfor2* und *p413TEFrev* auf ihre Identität überprüft, um sicherzugehen, dass es sich bei dem von den Hefezellen aufgenommenen Gen wirklich um *CmCRE1* handelte (Abschnitt 2.6.1). Zusätzlich wurden beide Klone sequen-

ziert und die ermittelten Daten mit der Sequenz von *CmCRE1* in Anhang D verglichen. Dafür wurden die Plasmide gemäß Abschnitt 2.4.4 aus den Hefezellen isoliert und aufgrund der größeren Produktivität in *E. coli* XL10-Gold-Zellen transformiert (Abschnitt 2.7.1). Die Transformanten wurden im PCR-Kolonie-'Screening' mit den Primern CRE1-FP0a und CRE1-RP0 getestet und je eine positive Kolonie mit den Plasmiden aus *CmCRE1-1* und *CmCRE1-7* über Nacht angezogen. Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem 'Wizard Plus Miniprep Kit' (Abschnitt 2.4.3). Je 1 µg Plasmid wurde für die Sequenzierung mit den folgenden Primern eingesetzt: *CmCRE1-1* mit p413TEFrev, CRE1Seq-RP, CRE1Seq-RP2, CRE1Seq-RP4, CRE1Seq-RP5, CRE1Seq-RP6; *CmCRE1-7* mit p413TEFfor2, p413TEFrev, CRE1Seq-FP5, CRE1Seq-RP, CRE1Seq-RP2 und CRE1Seq-RP4<sup>8)</sup>.

## 2.12 Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-PCR oder RT-PCR ist eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von spezifischen mRNA-Transkripten, die auf der exponentiellen Amplifizierung von DNA-Templates in einer PCR basiert. Dafür wird das Transkript in einer vorangestellten Reversen Transkriptase-Reaktion in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und diese anschließend als Template für die PCR eingesetzt. Die Quantifizierung des Transkriptes wird durch den Einsatz eines spezifischen internen Standards bekannter Konzentration erreicht, der in der PCR koamplifiziert wird. Bei diesem Standard handelt es sich um das gleiche Gen, welches sich nur in der Länge von dem Template unterscheidet. Es wird in demselben Reaktionsansatz mit denselben Primern amplifiziert wie das mRNA-Transkript, wodurch es zu einer Konkurrenzreaktion kommt. Nach dem Auftrennen der Reaktionsansätze mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.3.4) kann die Intensität der größenverschiedenen Banden miteinander verglichen werden und aufgrund der bekannten Konzentration des eingesetzten Standards der Transkriptgehalt des untersuchten Gens in ng/µg Gesamt-RNA abgeschätzt werden.

---

<sup>8)</sup>Die Sequenzierung wurde im Institut für Mikrobiologie der TU-Braunschweig durchgeführt.

### 2.12.1 Herstellung der Standard-RNA

Die Standard-RNA für das Gen *CmCRE1* wurde aus dem Klon 276 hergestellt (Tabelle 2.6), indem ein 503bp großes Fragment aus dem Gibberellin-Dioxygenasegen *CmGA3ox1* (LANGE ET AL. 1997) eingefügt wurde. Aus den Glycerin-Stammkulturen der *E. coli*-Stämme mit den gewünschten Plasmidkonstrukten wurden Übernacht-Kulturen in 10ml LB + Carbenicillin angezogen (Abschnitt 2.2.2). Die enthaltenen Plasmide wurden mit dem 'Wizard Plus Miniprep Kit' (Abschnitt 2.4.3) isoliert und anschließend in einem Restriktionsverdau mit *HindIII* geschnitten (Abschnitt 2.5.2). Dabei wurde das Hybridplasmid Klon 276 linearisiert, indem das Gen *CmCRE1* kurz nach dem Stopcodon (Sequenz in Anhang D) aufgeschnitten und anschließend mit dem 'E.Z.N.A. Cycle Pure Kit' aufgereinigt wurde (Abschnitt 2.4.5). Aus dem Gen *CmGA3ox1* wurde mit demselben Enzym ein 503bp großes Fragment ausgeschnitten, auf 1% Agarose aufgetrennt (Abschnitt 2.3.4) und mit dem 'QIAquick Gel Extraction Kit' aufgereinigt (Abschnitt 2.4.5). Der linearisierte Klon 276 wurde dephosphoryliert (Abschnitt 2.5.3) und dann mittels T4 DNA-Ligase mit dem 503bp-Fragment ligiert (Abschnitt 2.5.4), wobei das Insert im dreifachen molaren Überschuss zugegeben wurde. Nach einer Aufreinigung mit dem 'Cycle-Pure Kit' wurde der Ligationsansatz, wie in Abschnitt 2.7.1 angegeben, in elektrokompetente TOP10-Zellen (Tabelle 2.4) transformiert und der Transformationsansatz in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf X-Gal-Platten angezogen. 10 weiße Kolonien wurden mittels der genspezifischen Primer CRE1Seq-FP2 und CRE1-RP0 (Anhang C) im PCR-Kolonie-'Screening' untersucht (Abschnitt 2.6.1) und ein positiver Klon über Nacht in 10ml LB + Carbenicillin im Greinerröhrchen angezogen. Von diesem Klon RT9 wurde eine Glycerin-Stammkultur hergestellt (Abschnitt 2.2.2) und eine Plasmid-Präparation mittels 'Wizard Plus Miniprep Kit' durchgeführt (Abschnitt 2.4.3).

Die Plasmid-DNA des RT-Standards wurde in einer *in vitro*-Transkription unter Verwendung der T3-RNA-Polymerase in die gebrauchsfertige RNA umgeschrieben. Das Konstrukt RT9 wurde vom T3-Promotor aus gesehen hinter dem Gen mit dem Restriktionsenzym *XbaI* linearisiert (Abschnitt 2.5.2), so dass in der *in vitro*-Transkription keine überflüssige Plasmid-Sequenz umgeschrieben wurde. Der Verdau wurde mit dem 'E.Z.N.A. Cycle Pure Kit' aufgereinigt (Abschnitt 2.4.5) und 1µg als Template für den Transkriptionsansatz eingesetzt.

### *In vitro*-Transkription:

linearisiertes Plasmid (1 $\mu$ g)	x $\mu$ l
10x RNA-Polymerase-Puffer	2 $\mu$ l
NTP-Mix (je 10mM)	2 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
T <sub>3</sub> RNA-Polymerase	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 $\mu$ l

Der Ansatz wurde 2h bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden direkt im Thermocycler 0,14 $\mu$ l DNaseI (20U) zu dem Ansatz gegeben, mit der Pipettenspitze eingerührt und weitere 20min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion der RNA mit anschließender Ethanolfällung (Abschnitte 2.3.1 und 2.3.2). Das Pellet wurde in 15 $\mu$ l DEPC-Wasser (0,1% Diethylpyrocarbonat in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; SAMBROOK U. RUSSEL 2001) resuspendiert und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung in Aliquots bei -70°C gelagert.

### 2.12.2 Die Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Für die Reverse Transkription wurde das 'RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit' von MBI Fermentas verwendet. Es enthält eine aus dem Moloney Murine Leukemia Virus isolierte M-MuLV Reverse Transkriptase ohne RNase H-Aktivität. Mit Hilfe dieser Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, können einzelsträngige DNA-Moleküle synthetisiert werden, die komplementär zur Template-RNA sind (cDNA). Durch die fehlende RNase H-Aktivität findet parallel zur cDNA-Synthese keine Degradierung der RNA statt, was zu einer erhöhten Ausbeute vollständiger cDNA-Moleküle führt. Die Verwendung eines sequenzspezifischen RT-Primers erhöhte zusätzlich die Effizienz und Spezifität der RT-Reaktion im Vergleich zu Oligo(dT)- oder 'random'-Primern.

Für die RT-Reaktionen wurde je 100ng der zu untersuchenden Gesamt-RNA als Template eingesetzt (Abschnitt 2.4.1). Die Standard-RNA (Abschnitt 2.12.1) wurde ausgehend von einer 100ng-Stammlösung in 1:10 Verdünnungsstufen auf Konzentrationen von 100pg bis 10fg verdünnt. Es wurden stets mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Standardmengen parallel bearbeitet, um durch die Konzentrationsabstufung Rückschlüsse auf den Transkriptgehalt des untersuchten Gens ziehen zu können. Alle RNA-Proben wurden

## 2 Material und Methoden

so kurz wie möglich außerhalb des  $-70^{\circ}$ -Schrankes auf Eis gehalten. Die Vorbereitung und Durchführung der Reversen Transkription erfolgte in mehreren Schritten im Thermocycler. Zuerst wurde die RNA mit dem RT-Primer (Anhang C) 5min bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um eventuell vorhandene Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde die Nukleinsäurelösung mit Reaktionspuffer, Desoxynukleinsäuren und RNase-Inhibitor versetzt und zur Inaktivierung von RNasen im Ansatz weitere 5min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### Auflösung von Sekundärstrukturen:

Gesamt-RNA (100ng)	2 $\mu\text{l}$
Standard-RNA (Konzentration variabel)	0,5 $\mu\text{l}$
RT-Primer (CRE1-RT1, 10pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$

### Inaktivierung von RNasen:

Nukleinsäurelösung	3 $\mu\text{l}$
5x RT-Reaktionspuffer	1 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix (jeweils 10mM)	0,5 $\mu\text{l}$
RNase-Inhibitor (20U/ $\mu\text{l}$ )	0,25 $\mu\text{l}$

Abschließend folgte die Zugabe von 0,25 $\mu\text{l}$  Reverser Transkriptase, die vorsichtig mit der Pipettenspitze in den Ansatz gemischt wurde. Nach 1h Inkubation bei  $42^{\circ}\text{C}$  wurde das Enzym durch ein zehnminütiges Erhitzen auf  $70^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde sofort für die PCR eingesetzt (Abschnitt 2.6). Die PCR zur Amplifizierung von Gesamt- und Standard-RNA wurden mit den Primern CRE1-forward und CRE1-RP0 (Anhang C) unter Verwendung des PCR-Programms für die Plasmid-DNA (Anhang B) mit einer Annealingtemperatur von  $61^{\circ}\text{C}$  und 2,5min Elongationszeit bei  $72^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die RT-Reaktionen wurden 1:10 verdünnt und je 1 $\mu\text{l}$  der Verdünnung als Template verwendet. Zur Auswertung wurden die PCR-Ansätze auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt (Abschnitt 2.3.4) und die weißen Pixel der Banden auf den Gelfotos mit dem Programm 'Scion Image' (Scion Corporation) ausgezählt. Da die Pixel des RNA-Standards einer bekannten Einsatzmenge entsprachen, wurde anhand der Pixelmenge die Menge des nachzuweisenden Transkriptes bestimmt und auf 1 $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA bezogen.

### 2.12.3 Überprüfung der RNA-Qualität

Jede verwendete RNA-Probe wurde aufgrund der natürlichen Empfindlichkeit gegenüber RNasen regelmäßig auf ihre Qualität überprüft. Dabei wurde die photometrisch bestimmte Konzentration der Proben bestätigt sowie der Degradierungsgrad untersucht. Je 100ng der untersuchten Proben wurden auf 1% Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.3.4) und optisch abgeschätzt, ob die Konzentrationen untereinander vergleichbar und die Banden der ribosomalen RNA (rRNA) ähnlich ausgeprägt waren (Abbildung 2.6). Eine Degradierung der RNA machte sich durch ein Verschwimmen dieser Banden bemerkbar. Die Proben blieben mehrere Wochen lang stabil. War eine Degradierung auffällig, wurde ein neues Aliquot angebrochen. Daneben wurden die RNA-Proben auf kontaminierende DNA untersucht, indem je 100ng als Template für eine PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt wurde (Abschnitt 2.6). Da die DNA-Polymerase RNA nicht amplifiziert, durfte bei der anschließenden Gelanalyse keine Bande sichtbar sein. War doch ein Signal zu erkennen, rührte es von kontaminierender DNA her. In diesem Fall wurde

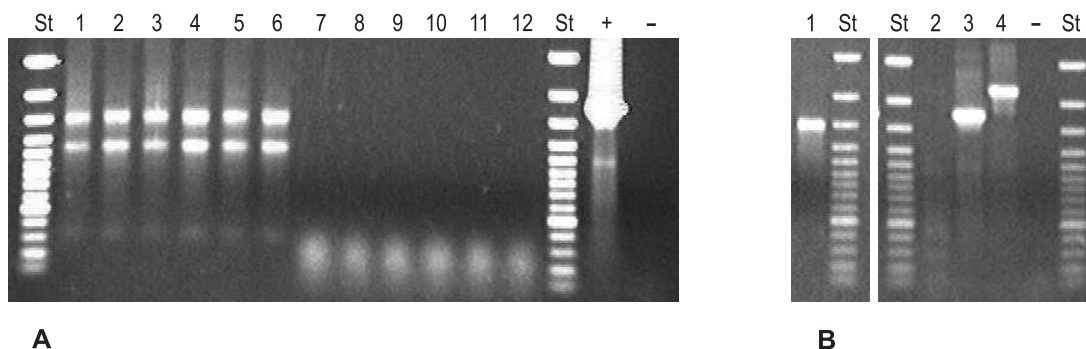


Abbildung 2.6: Qualitätsprüfung von Gesamt-RNA und Standard-RNA.

**(A)** Überprüfung der Gesamt-RNA aus Spross- und Wurzelgewebe von drei, vier und fünf Tage alten Kürbiskeimlingen: **1 – 6:** je 100ng Gesamt-RNA; **7 – 12:** PCR mit 100ng Gesamt-RNA als Template (Primer: CRE1-forward/CRE1-RP0). **1 und 7:** 3 Tage, Spross; **2 und 8:** 3 Tage, Wurzel; **3 u. 9:** 4 Tage, Spross; **4 u. 10:** 4 Tage, Wurzel; **5 u. 11:** 5 Tage, Spross; **6 und 12:** 5 Tage, Wurzel.

**(B)** Überprüfung der Standard-RNA: **1:** 100ng Standard-RNA; **2 – 4:** PCR (Primer: CRE1-forward/CRE1-RP0) mit folgenden Templates: **2:** 100ng Gesamt-RNA; **3:** Klon 276 (10pg Plasmid); **4:** Klon RT9 (10pg Plasmid).

**St:** 100bp-Standard; PCR-Kontrollen: **+**: Klon 276 (1ng Plasmid); **-**: Negativkontrolle ohne Template.

die Gesamt-RNA einem erneuten DNaseI-Verdau unterzogen (Abschnitt 2.5.1), da ein DNA-basiertes Signal die Quantifizierung der Transkripte verfälscht hätte.

### 2.12.4 Expressionsstudien in unterschiedlichen Geweben

Die RT-PCR für die durchgeführten Expressionsstudien fanden in der Regel in zwei unabhängigen Durchgängen statt, wurden jedoch mit derselben Gesamt-RNA angesetzt. Zur Herstellung der Gesamt-RNA wurde Gewebematerial aus mehreren Einzelpflanzen verwendet. Die Anzucht und Ernte der Pflanzen sowie die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte wie in den Abschnitten 2.1 und 2.4.1 beschrieben. Die ersten Untersuchungen von *CmCRE1*-Transkripten fanden in keimenden Kürbissamen und den daraus entstehenden Keimlingen im Alter von 2 bis 5 Tagen statt (Ernte 5, Anhang A). Dafür wurden die Kürbissamen unter Langtagsbedingungen angezogen und jeden Tag 10 Keimlinge geerntet. Die 2 Tage alten Keimlinge wurden vollständig für die Extraktion von Gesamt-RNA eingesetzt, da noch keine Unterscheidung zwischen Wurzel und Spross möglich war. Die weiteren Keimlinge (3 bis 5 Tage alt) wurden jeweils 24h später geerntet und dabei in Spross und Wurzel unterteilt. Um die Expression von *CmCRE1* in Abhängigkeit exogen applizierter Cytokinine zu bestimmen, wurden je 12 Keimlinge fünf Tage lang mit Nährlösungen gegossen, die mit *t*-Zeatin respektive Kinetin versetzt worden waren (Abschnitt 2.1.2 und Ernte 6). Hier wurden Spross und Wurzeln geerntet. Die lichtabhängige Expression wurde in fünf Tage alten Keimlinge untersucht (Ernten 7 und 8). Dafür wurden je 50 Samen parallel unter Langtagbedingungen und in völliger Dunkelheit angezogen und die fünf Kompartimente Wurzelspitzen, Wurzelrest, Hypokotyl, Kotyledonen und Apikalspitze mit Folgeblättern geerntet. Hier wurde nur ein RT-PCR-Durchgang durchgeführt.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Konstruktion einer cDNA-Expressionsbibliothek

Die cDNA für die Konstruktion der Expressionsbibliothek wurde größenfraktioniert, wobei 11 Fraktionen entstanden, deren cDNA-Fragmente unterschiedlicher Größe in der Agarosegelelektrophorese sichtbar wurden (Abbildung 3.1). In den Fraktionen 1 bis 3 ist keine cDNA zu erkennen, in den Fraktionen 8 bis 11 dagegen sieht man neben der cDNA auch überzählige Adapterarme, Oligo(dT)-Primer und Nukleotide aus den vorangegangenen Enzymreaktionen. Sie sind als heller Fleck am unteren Ende der Spur bei ca. 100bp zu erkennen. Da diese Oligonukleotide aufgrund ihrer geringen Größe bevorzugt ligiert werden, wurden die Fraktionen 8 bis 11 für die Ligation in den Plasmidvektor

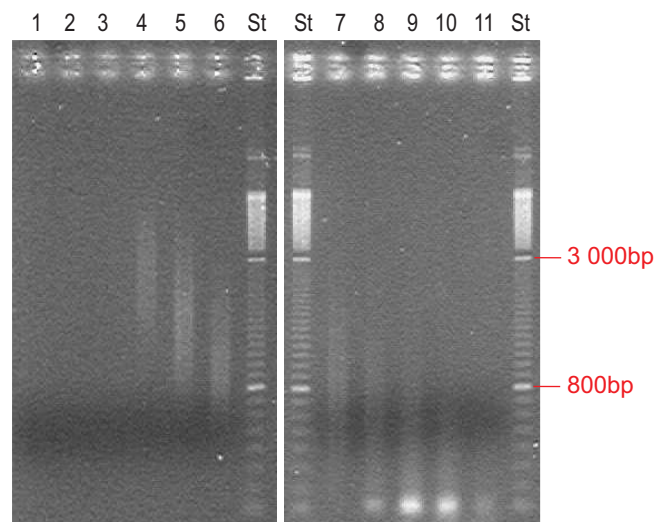


Abbildung 3.1: Größenbestimmung der cDNA nach der Fraktionierung mittels Sepharose CL-2B Säule. Die cDNA-Bank-Fraktionen **1** bis **11** sind durchnummeriert. **St**: 100bp-Standard (Amersham).

### 3 Ergebnisse

nicht verwendet. Die Fraktionen 4 bis 7 enthielten cDNA-Fragmente unterschiedlicher Größen. In der Fraktion 4 waren die größten cDNA-Moleküle enthalten (etwa 1 100 bis 5 000bp), in Fraktion 5 mit ca. 800 bis 4 000bp etwas kleinere. Fraktion 6 enthielt cDNA-Fragmente von 600 bis 2 000bp und Fraktion 7 die kleinsten von 400 bis 1 500bp. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nur die Fraktionen 4 bis 7 im 'Ethidium-Bromid Plate Assay' quantifiziert.

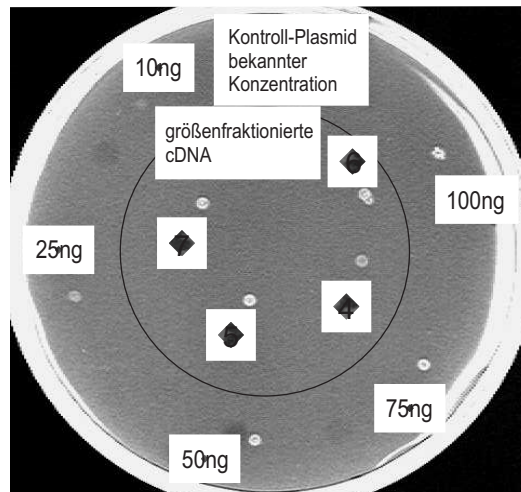


Abbildung 3.2: Konzentrationsbestimmung der größtenfraktionierten cDNA mittels 'Ethidium-Bromid Plate Assay'.

Die Fraktionen 4 bis 7 sind in der Mitte der Platte aufgetragen, das Kontrollplasmid (pUC18) mit den angegebenen Konzentrationen außen.

Anhand der Intensität der Ethidiumbromid-gefärbten Kontroll-DNA in Abbildung 3.2 wurde der DNA-Gehalt der Fraktionen 4 bis 7 optisch abgeschätzt. Die Fraktionen 5, 6 und 7 waren etwa genauso intensiv gefärbt wie die Plasmidprobe mit der Konzentration von 50ng/ $\mu$ l. Deshalb wurde für diese drei Fraktionen ebenfalls eine Konzentration von 50ng/ $\mu$ l zugrunde gelegt. Die Fraktion 4 war etwas geringer konzentriert. Die Intensität der Färbung lag zwischen 25 und 50ng/ $\mu$ l, weshalb von einer Konzentration von 35ng/ $\mu$ l ausgegangen wurde. Ausgehend von diesen Werten wurde die cDNA für die Ligation in den Plasmidvektor pB-SK(+) auf eine einheitliche Konzentration von 5ng/ $\mu$ l verdünnt. Die fertige cDNA-Expressionsbibliothek war in die vier Fraktionen 4, 5, 6 und 7 aufgeteilt, die Inserts unterschiedlicher Größe enthielten. Durch das Auszählen der Transformationsansätze vor der Amplifizierung wurde ermittelt, dass die komplette

### 3.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

Bank aus ca. 1 Million unabhängiger Klone bestand (Tabelle 3.1). Von diesen enthielten nur etwa 15% leere Plasmide, was durch das Blau-Weiß-'Screening' deutlich wurde. Bei einem Kolonie-'Screening' zeigte sich eine deutliche Größenstaffelung der Inserts.

Tabelle 3.1: Die Qualität der cDNA-Expressionsbibliothek.

Fraktion	unabhängige Klone	leere Plasmide	Größe der Inserts (PCR-Kolonie-Screen)
4	100 000	15%	1 200 – 2 400bp
5	340 000	15%	900 – 1 800bp
6	200 000	20%	700 – 2 500bp
7	390 000	15%	300 – 900bp

## 3.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

Aus der cDNA-Expressionsbibliothek aus dem Hypokotyl 7 Tage alter etiolierter Kürbis-keimlinge wurde mit degenerierten Primern das PCR-Fragment eines CRE1/AHK4-Genhomologen isoliert (Abschnitt 3.2.1). Unter Verwendung genspezifischer Primer wurde schließlich ein Klon mit der unvollständigen Sequenz parallel mit zwei verschiedenen Methoden aus der Genbank vereinzelt (Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3).

### 3.2.1 PCR-basiertes 'Screening' mit degenerierten Primern

Basierend auf den Sequenzen unterschiedlicher Histidin-Kinasen und Histidin-Kinase-ähnlicher Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* entstanden vier Forward-Primer und drei Reverse-Primer mit unterschiedlichem Degenerierungsgrad (Abbildung 3.3 und Anhang C). Die Forward-Primer und 2KR-R1 liegen in konservierten Regionen der Histidin-Kinase-Domänen der ausgewählten Sequenzen. Die beiden Reverse-Primer 2KR-R2 und 2KR-R3 befinden sich in konservierten Bereichen der Empfänger-Domäne. Bei der Auswahl der Primer-Bindungsstellen wurde darauf geachtet, dass die essenziellen Merkmale einer Histidin-Kinase vertreten waren. So liegen 2KR-F1, 2KR-F4 und 2KR-R1

### 3 Ergebnisse

in den hochkonservierten Regionen H (mit dem phosphorylierbaren Histidinrest H) und G2 der Histidin-Kinase-Domäne (Abbildung 1.3). 2KR-R2 umschließt den phosphorylierbaren Aspartatrest (D) in der Empfänger-Domäne.

				2KR-F1				2KR-F2		2KR-F3			
AtAHK4	449	AKSQFLATWSHEIRTPMNGILGML	472...500					LINEVLDRAKTEAGKLELE	518				
ZmHK1	359	AKSQFLATASHEIRTPMNGVLGML	382...410					LINDVLDRAKTEAGKLELE	428				
AtETR1	343	ARNDFLAVNNHEMRTPMHAIALS	366...394					LMNDVLDLSRLEDGSLQLE	367				
AtEIN4	367	ARNTCQKVMESHGMRRPMHTILGLL	390...418					LINDVIDISPDMGKSALE	436				
AtERS2	382	AKAAFEQMMSDAMRCFVRSILGLL	405...434					LVNNAGDIN--NGTIRAAE	452				
AtAHK1	498	YKSQFLANMSHELRTPMMAVIGLL	521...550					LLNNILDLSKVESGKLVLE	568				
AtCKI1	395	NKSQAFANASHDIRGALAGNGLL	419...447					LLNSVLDNSKIESGKMQLV	465				
		2KR-F4 und 2KR-R1				2KR-R2						2KR-R3	
AtAHK4	697	GGTGIGL	704...971			FMDIQMPQMDGFEATQIR			989...1026			GMDGYVSKP	1035
ZmHK1	615	GGTGIGL	622...878			FMDVQMPQMDGFEATQIR			896...944			GMDGYVSKP	953
AtETR1	542	GGSGLGL	549...657			FMDVQMPGVENYQIALRIH			675...707			GLDGVLKPK	716
AtEIN4	573	IKEGLSL	580...692			INDIQMPQMDGFEVANKIR			710...739			GMNGMIQKP	748
AtERS2	578	EEENPSL	585...637			-----			637...645			-----	645
AtAHK1	723	GGTGLGL	730...1125			LMDCQMPKMDGYEATKAIR			1143...1174			GMDAYLTKP	1183
AtCKI1	629	QGTGLGL	636...1048			FMDQMPQMDGYEATREIR			1066...1098			GMDAFLDKS	1107

Abbildung 3.3: Entwicklung degenerierter Primer auf der Basis eines Alignments sieben verschiedener Histidin-Kinasen und Histidin-Kinase-ähnlicher Proteine.

Alle mit At bezeichneten Gene stammen aus *A. thaliana*, ZmHK1 entstammt *Z. mays*. Die verwendeten Sequenzen haben folgende Genbank-Zugangsnummern: **AtAHK4**: AB046871; **ZmHK1**: Q9FRY7; **AtETR1**: NM\_105305; **AtEIN4**: NM\_111329; **AtERS2**: NM\_129658; **AtAHK1**: NM\_127335; **AtCKI1**: NM\_130311. Die roten Striche markieren die Position der Primer. Schwarze Boxen beschreiben identische Aminosäuren, graue Boxen ähnliche. Das Alignment wurde durchgeführt mit dem BCM Search Launcher (Abschnitt 2.10.3).

Mit den Primerkombinationen 2KR-F3/2KR-R2 in der äußeren PCR und 2KR-F3/2KR-R1 in der inneren PCR gelang es, bei einer Annealingtemperatur von 45°C in beiden Reaktionen, ein etwa 620bp großes Fragment zu amplifizieren. Sowohl in der äußeren (Abbildung 3.4 A), als auch in der inneren PCR (Abbildung 3.4 B) kam es zur Amplifizierung einer Vielzahl von Banden. Die Reaktionen mit der cDNA-Bank als Template (+) wurden direkt neben den Ansätzen mit leeren Plasmiden (-) aufgetragen. So ließ sich gut erkennen, dass die meisten Banden sowohl in den Proben mit cDNA als auch in den Proben ohne cDNA auftauchten. Auch die PCR-Ansätze mit dem einzelnen Reverse-Primer 2KR-R2 zeigten eine hohe Anzahl von PCR-Signalen, die mit der Primerkombination 2KR-F3/2KR-R2 ebenfalls auftauchten (Abbildung 3.4 A). Der Forward-Primer 2KR-F3

### 3.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

allein verursachte keine deutlichen Signale. Die Ansätze der inneren PCR wiesen mit dem einzelnen Reverse-Primer 2KR-R1 eine hohe Anzahl von Fragmenten auf, die aber nicht in der Kombination mit dem Forward-Primer 2KR-F3 zu sehen waren (Abbildung 3.4 B). In der PCR mit der Primerkombination 2KR-F3/2KR-R1 erschien jedoch ein Signal von ca. 620bp (rot umrandet), das nicht in den Proben mit 2KR-F3 oder 2KR-R1 allein oder mit dem leeren Plasmid auftauchte. Da auf dem Alignment basierend, mit dieser Primerkombination eine Bande von 440 bis 630bp Länge zu erwarten war, wurde das PCR-Signal von 620bp kloniert und transformiert.

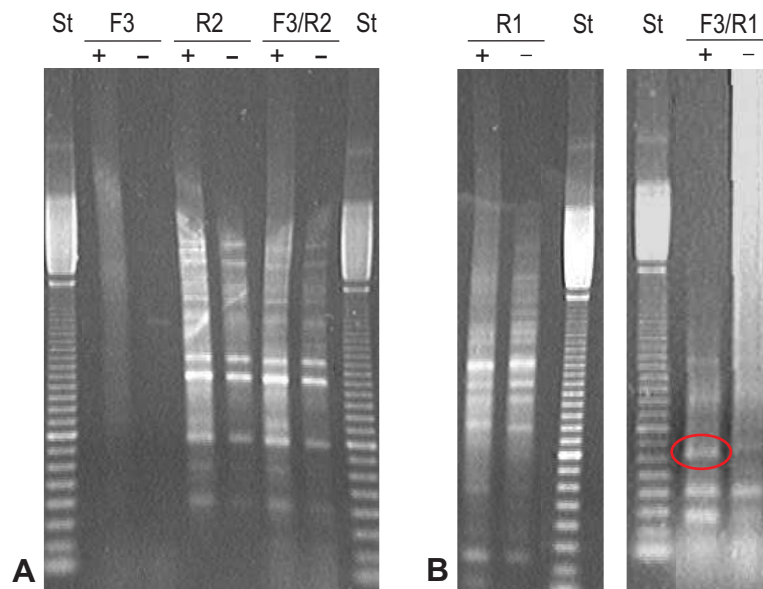


Abbildung 3.4: PCR-basiertes 'Screening' mit degenerierten Primern.

**(A)** Äußere PCR. **St**: 100bp-Standard (Amersham); verwendete Primerkombinationen: **F3**: 2KR-F3 einzeln, **R2**: 2KR-R2 einzeln, **F3/R2**: beide Primer; **+**: Plasmidpräparation der cDNA-Bank (100ng Plasmid), **-**: leeres Plasmid pB-SK(+) (100ng Plasmid). **(B)** Innere PCR. verwendete Primerkombinationen: **R1**: 2KR-R1 einzeln, **F3/R1**: beide Primer. Das gesuchte Signal ist rot markiert.

18 von 20 untersuchten Transformanten zeigten in einer M13-PCR ein Fragment von ungefähr 820bp Länge (ca. 620bp Insert + 201bp MCS des Vektors). Der Klon 4 wurde ausgewählt und das einklonierte Genfragment mit M13-Primern von beiden Seiten sequenziert. Das in Klon 4 enthaltene cDNA-Fragment wies eine Länge von 621bp auf.

### 3 Ergebnisse

Ein Aminosäuresequenzvergleich dieses Fragmentes mit Protein-Datenbanken zeigte eine 70%ige Identität (81% Ähnlichkeit) zu den Genen CRE1a (GAN: AB049934) und CRE1b (GAN: AB049935) von *A. thaliana* auf. Basierend auf den Sequenzdaten wurden die spezifischen Primer CRE1-forward und CRE1-reverse (Anhang C) für das erneute Durchsuchen der cDNA-Bibliothek und die Isolierung eines Einzelklons erstellt.

#### 3.2.2 PCR-basiertes 'Screening' mit genspezifischen Primern

Die Isolierung eines Einzelklons aus der Fraktion 4 der cDNA-Expressionsbibliothek (vergleiche mit Tabelle 3.1) erfolgte in fünf 'Screening'-Runden. Die verwendeten spezifischen Primer CRE1-forward und CRE1-reverse definieren ein 323bp großes DNA-Fragment, nach dem die cDNA-Bank durchsucht wurde. In der ersten 'Screening'-Runde wurde das erwartete Fragment sowohl in Probe 4-12 als auch in 4-20 amplifiziert (Abbildung 3.5). Beide Ansätze stellten somit geeignetes Ausgangsmaterial für ein Durchsuchen nach dem CRE1/AHK4-homologen Gen dar. Mit dem leeren Plasmidvektor pB-SK(+) in der Negativkontrolle konnte keine Bande amplifiziert werden. Das zeigte, dass die Primer keine unspezifischen Wechselwirkungen mit der hohen Konzentration an Plasmid-DNA eingingen, die für das 'Screening' eingesetzt wurde.

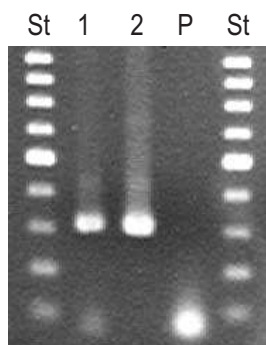


Abbildung 3.5: 'Screening'-Runde 1 (2x 10 000 cfu)

Untersuchung der Proben 4-12 und 4-20 mit CRE1-forward und CRE1-reverse. **St**: 100bp-Standard; **1**: Probe 4-12; **2**: Probe 4-20; **P**: pB-SK(+) ohne Insert. Je 100ng Plasmid als Template.

Für die zweite 'Screening'-Runde wurde die Probe 4-20 in 20 Proben mit je 2 000 cfu aufgeteilt (4.20-1 bis 4.20-20), von denen nur eine die 323bp-Bande in der PCR aufwies. Die Probe 4.20-5 zeigte in der Gelanalyse ein Signal, das genau so intensiv wie das der Positivkontrolle war (Abbildung 3.6). Als Positivkontrolle für die PCR diente in allen Runden die jeweils positive Probe aus der vorangegangenen 'Screening'-Runde. Fast alle

### 3.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

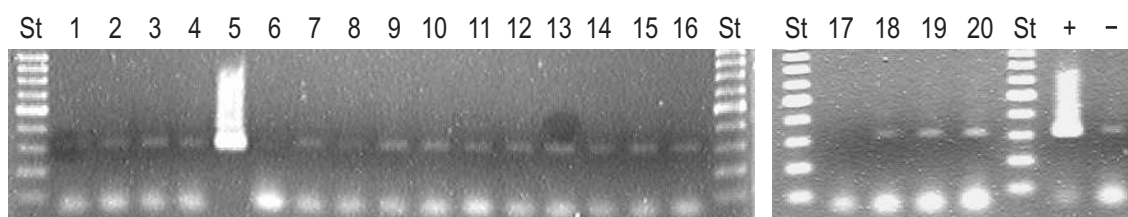


Abbildung 3.6: 'Screening'-Runde 2 (20x 2 000 cfu).

**St:** 100bp-Standard; **1 – 20:** Proben 4.20-1 bis 4.20-20; **+**: Positivkontrolle mit der positiven Probe 4-20 als Template; **-**: Negativkontrolle ohne Template. Je 100ng Plasmid als Template.

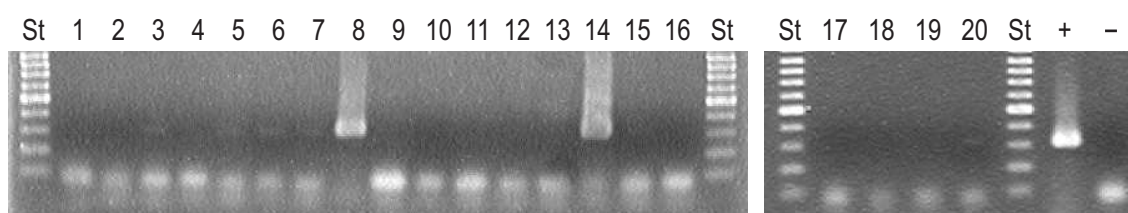


Abbildung 3.7: 'Screening'-Runde 3 (20x 400 cfu).

**St:** 100bp-Standard; **1 – 20:** Proben 4.20.5-1 bis 4.20.5-20; **+**: Positivkontrolle mit der positiven Probe 4.20-5 als Template; **-**: Negativkontrolle ohne Template. Je 100ng Plasmid als Template.

Proben der 'Screening'-Runde 2 wiesen auf dem Agarosegel eine schwache Bande von ebenfalls etwa 320bp Größe auf, die vermutlich von einer DNA-Kontamination herrührte. Das spezifische Signal in Probe 4.20-5 hob sich jedoch deutlich in der Intensität ab.

Von Stammkultur 4.20-5 ausgehend wurden 20 x 400 cfu untersucht (4.20.5-1 bis 4.20.5-20). In dieser dritten 'Screening'-Runde führte die PCR zu zwei positiven Ansätzen, nämlich 4.20.5-8 und 4.20.5-14 (Abbildung 3.7). Sie wiesen eine ebenso deutliche 323bp-Bande auf wie die Probe 4.20-5 aus der vorangegangenen 'Screening'-Runde. Für die vierte 'Screening'-Runde wurden 325 Einzelkolonien aus der Stammkultur 4.20.5-8 in Gruppen zu je 20 Kolonien zusammengefasst und in der PCR untersucht. In den Gruppen K und N wurde die 323bp-Bande amplifiziert (Abbildung 3.8), d.h. mindestens einer der 20 Klone in diesen Gruppen fungierte als Template für die genspezifischen Primer. Die Einzelklone der beiden positiven Gruppen K und N wurden in der fünften Runde direkt für ein PCR-Kolonie-'Screening' eingesetzt. Die beiden Einzelklone 207 und 276 zeigten die



### 3 Ergebnisse

gesuchte 323bp-Bande (Abbildung 3.9) und wurden mittels PCR und Restriktionsverdau eingehender untersucht (Abschnitt 3.2.4).

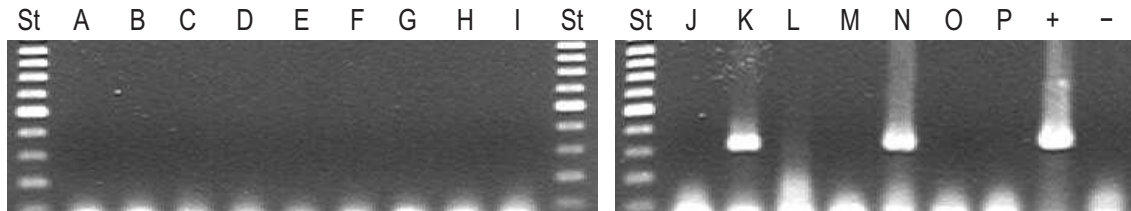


Abbildung 3.8: 'Screening'-Runde 4 (16 Gruppen mit je 20 Klonen).

**St:** 100bp-Standard; **A – P:** Gruppen A – P; **+**: Positivkontrolle mit der positiven Probe 4.20.5-8 als Template; **–** : Negativkontrolle ohne Template. Je 10ng Plasmid als Template.

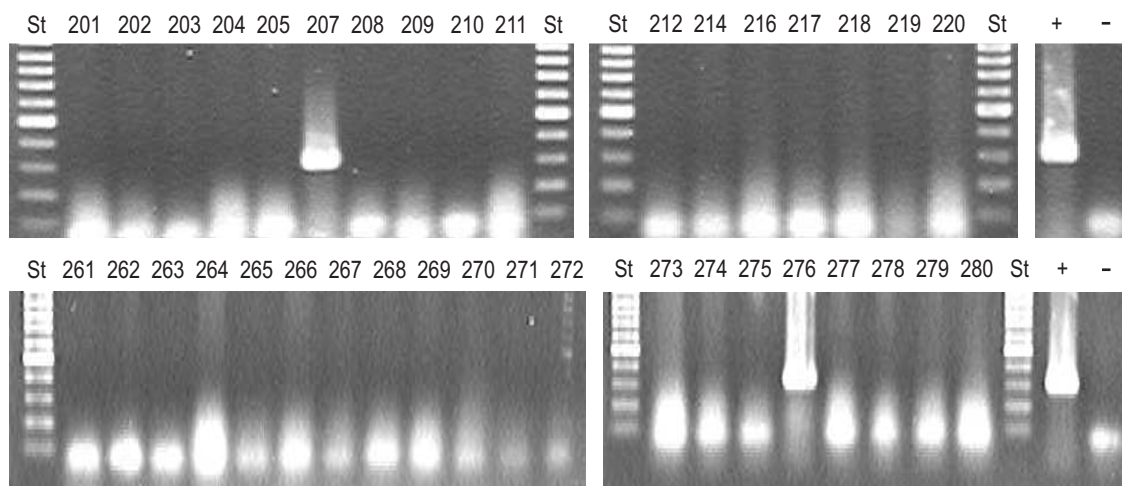


Abbildung 3.9: 'Screening'-Runde 5 (Kolonie-'Screening').

**St:** 100bp-Standard; **201 – 280:** Nummern der Einzelkolonien; **+**: Positivkontrolle mit der positiven Probe 4.20.5-8 als Template; **–** : Negativkontrolle ohne Template. Koloniematerial von der Masterplatte als Template.

#### 3.2.3 Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde

In den ersten drei 'Screening'-Runden wurden 20 Platten mit je 2 000 cfu mittels Hybridisierung getestet und auf diese Weise etwa 40 000 Kolonien der Probe 4-20 untersucht. In der dritten 'Screening'-Runde war auf einer Platte ein sehr schwach ausgebildetes



### 3.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

Hybridisierungssignal zu erkennen (Ergebnis nicht dargestellt). Da an dieser Position auf der Originalplatte keine eindeutige Einzelkolonie zu sehen war, wurde etwas Koloniematerial aus dieser Region erneut hybridisiert (Abbildung 3.10). Sechs bläuliche DIG-Markierungen waren auf der Nylon-Membran zu erkennen, die sich den Kolonien auf der Originalplatte eindeutig zuordnen ließen. Die Klone H1 – H4 lagen als isolierte Einzelkolonien auf der Agarplatte vor. Die Klone H5 und H6 jedoch lagen in direkter Nachbarschaft zu anderen, nicht markierten Kolonien. In weiteren drei 'Screening'-Runden wurden auf die gleiche Weise 25x 3 000 cfu der gesamten cDNA-Bank-Fraktion 4 untersucht und 2 weitere DIG-markierte Kolonien auf den Membranen identifiziert (Ergebnisse nicht dargestellt).

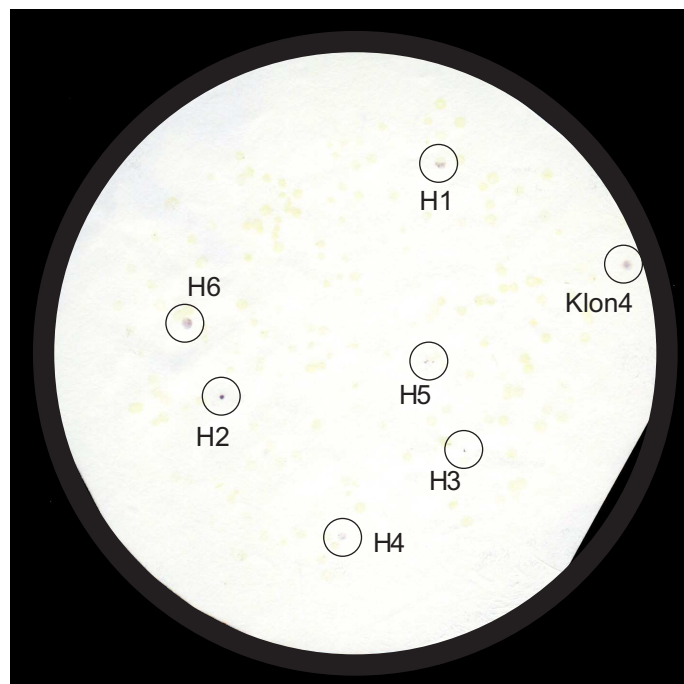


Abbildung 3.10: Untersuchung der Probe 4-20 mittels Hybridisierung.

**H1 – H6:** positive Kolonien, mit DIG markiert; **Klon 4:** Koloniematerial des Klons 4 als Positivkontrolle auf die Agarplatte gepunktet.

#### 3.2.4 Überprüfung der isolierten Klone

Die isolierten Klone 207 und 276 aus dem Abschnitt 3.2.2 wurden mit M13-Primern auf die Größe ihrer Inserts überprüft (Abbildung 3.11 A). Im Fall von Klon 276 wurde ein

### 3 Ergebnisse

ca. 2 300bp großes Signal erzeugt, von dem 201bp von der MCS des Vektors pB-SK(+) herrührten. Der Klon 207 zeigte dagegen kein Signal mit den im Plasmid bindenden M13-Primern, weshalb auch keine Aussage über die Größe des inklonierten Inserts getroffen werden konnte.

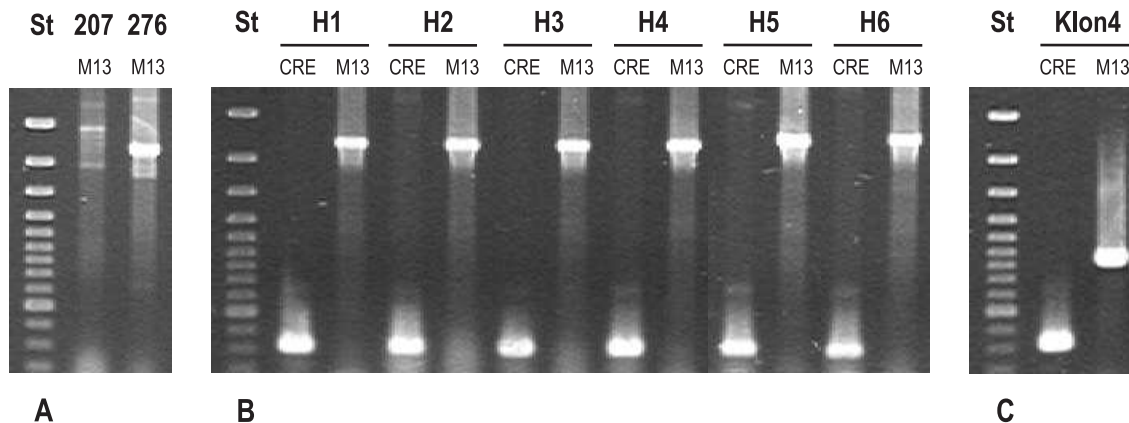


Abbildung 3.11: Überprüfung der isolierten Klone mittels PCR.

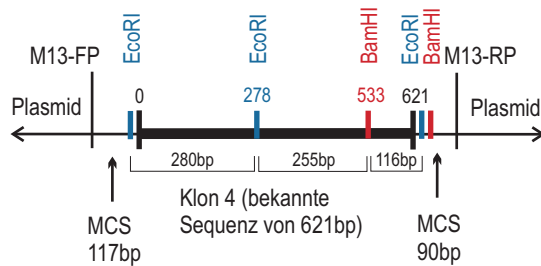
**(A)** Isolierte Einzelkolonien aus dem PCR-basierten 'Screening'. **St**: 100bp-Standard; **207** und **276**: Klon 207 und 276; **M13**: PCR mit M13-Primern. **(B)** Isolierte Einzelkolonien aus der Hybridisierung. **H1 – H6**: Klon H1 – H6; **CRE**: PCR mit genspezifischen Primern; **M13**: PCR mit M13-Primern. **(C)** **Klon 4** als Kontrollansatz. In allen Fällen wurde Koloniematerial als Template eingesetzt.

Die mittels Hybridisierung isolierten Klone H1 bis H6 wurden ebenfalls in einer PCR untersucht. In Abbildung 3.11 B ist jeweils auf der linken Seite eines untersuchten Klons das 323bp große amplifizierte Fragment mit den genspezifischen Primern CRE1-forward und CRE1-reverse zu erkennen. Auf der rechten Seite sieht man das mit M13-Primern erzeugte Signal, welches die Größe des Inserts plus 201bp MCS des Plasmids anzeigt. Die Klone H1 bis H6 wiesen mit etwa 2 100bp alle ein Insert derselben Größe auf wie der Klon 276 (Abbildung 3.11 A). Zum Vergleich wurde Koloniematerial des Klons 4 in der PCR analysiert (Abbildung 3.11 C). Auch hier sieht man das 323bp-Fragment, welches die beiden genspezifischen Primer definieren, sowie ein Fragment von etwa 820bp Größe mit den M13-Primern (621bp Insert und 201bp MCS). Die weiteren 2 hybridisierten Kolonien aus den drei 'Screening'-Runden, mit denen die gesamte cDNA-Bank-Fraktion 4 durchsucht wurde (Abschnitt 3.2.3), wurden ebenfalls noch einmal analysiert. In der PCR mit den M13-Primern zeigte keines der untersuchten Gene ein Fragment, das länger

### 3.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

als die der Klone H1 und 276 war (ohne Abbildung). Einer der Klone enthielt ein Insert von ca. 1 500bp Größe und das zweite Insert war mit einer Größe von etwa 2 100bp genau so groß wie in den Klonen H1 und 276. Diese beiden Klone wurden nicht weiter untersucht.

#### A Klon 4 in pCR2.1-TOPO



#### B CRE1-Kandidaten in pB-SK(+)

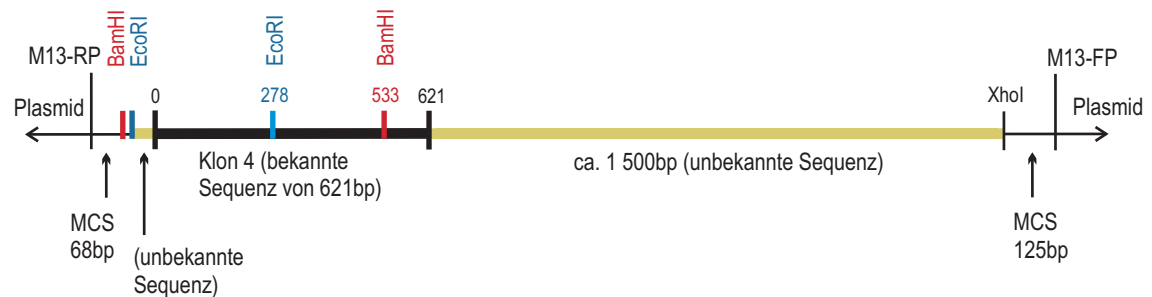


Abbildung 3.12: Restriktionsmuster der isolierten Klone.

(A) Restriktionsmuster des Klons 4 in dem Plasmid pCR2.1-TOPO. (B) Restriktionsmuster der isolierten Klone in dem Plasmid pB-SK(+).

Die isolierten und mit PCR positiv getesteten Einzelklone 276 und H1 wurden im Restriktionsverdau mit dem Restriktionsmuster von Klon 4 verglichen. Mit Klon 4 waren nur 621bp des gesuchten Gens bekannt, das Insert der Klone 276 und H1 hatte aber eine Größe um die 2 100bp, weshalb für weite Teile des Gens das Restriktionsmuster unbekannt war. Dennoch zeigte die Sequenz der bekannten 621bp, dass die beiden Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* ein 255bp großes DNA-Fragment herausschneiden (Abbildung 3.12 A). In der gelelektrophoretischen Auftrennung des Verdaus konnte man die 255bp-Bande erkennen, die aus dem Klon 4 durch den Doppelverdau mit *EcoRI* und

### 3 Ergebnisse

*Bam*HI herausgeschnitten wurde (Abbildung 3.13). Die beiden Enzyme schnitten diese Bande ebenso aus der Plasmid-DNA der Klone 276 und H1. Daneben zeigte das Restriktionsmuster der Klone 276 und H1 noch weitere Banden von ungefähr 900, 400 und 300bp Länge, die durch weitere Schnittstellen in den Inserts sowie der MCS entstanden (Abbildung 3.12 B). Der Verdau des Klons 276 verlief unvollständig, was sich durch eine weitere schwache Bande auf der Höhe des unverdauten Plasmids zu erkennen gab.

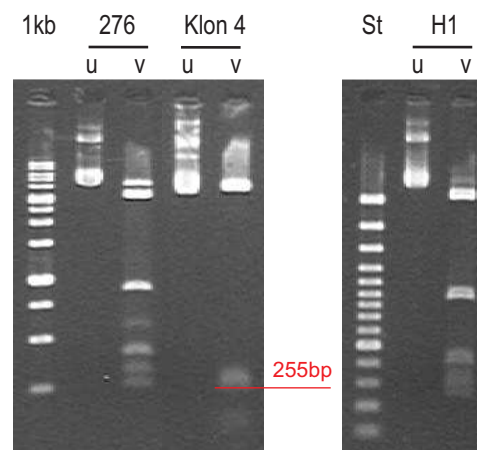


Abbildung 3.13: Identitätsprüfung der isolierten Klone mittels Restriktionsverdau.

**1kb:** 1kb-Standard; **276:** Klon 276 aus dem PCR-basierten 'Screening'; **Klon 4:** Kontrollansatz. **St:** 100bp-Standard; **H1:** Klon H1 aus der Hybridisierung. **u:** unverdaut; **v:** Doppelverdau mit *Eco*RI und *Bam*H1. Verdau von 500ng Plasmid-DNA.

Die Klone 276 und H1 wurden mit M13-Primern, CRE1-reverse, CRE1Seq-RP2, CRE1Seq-RP, CRE1Seq-FP, CRE1Seq-FP2, CRE1Seq-FP2a von beiden Seiten durchsequenziert und anschließend miteinander abgeglichen. Das mit *Eco*RI und *Xho*I einklonierte cDNA-Fragment hatte in beiden Fällen eine Länge von 2 072bp und endete mit dem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende (Anhang D). Ein Homologie-Vergleich mit Protein-Datenbanken mittels BLAST2-Suche (Abschnitt 2.10.3) wies auf eine große Ähnlichkeit zu dem Cytokininrezeptor CRE1/AHK4 mit der Genbank-Zugangsnummer AB046871 hin (70% Identität, 80% Ähnlichkeit). Ein anschließendes Alignment mit homologen Sequenzen aus der BLAST2-Suche zeigte jedoch, dass das isolierte Genfragment im Vergleich etwa 1 000 bis 1 500bp kürzer war als diese und kein Startcodon enthielt.

### 3.3 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR

Aus der cDNA-Bibliothek aus dem Hypokotyl 7 Tage alter Kürbiskeimlinge waren zwei Klone isoliert worden, die 2 072bp eines CRE1/AHK4-homologen Gens mit dem Namen *CmCRE1* enthielten (Abschnitt 3.2). Aufgrund der Herstellungsweise der cDNA-Bank mit Hilfe von oligo(dT)-Linker-Primern war das 3'-Ende ausgehend vom Poly-A-Schwanz des Gens kloniert. Die vollständige Sequenz des *CmCRE1*-Gens war nicht bekannt. Die Isolierung des fehlenden 5'-Endes wurde mit der RACE-PCR erreicht, indem genspezifische Primer im bekannten Teil des Gens und Primer für einen ligierten Adapterarm auf der anderen Seite das dazwischenliegende Genfragment in einer verschachtelten PCR amplifizierten (Abschnitt 2.10).

#### 3.3.1 Amplifizierung der RACE-Produkte

Die Proben der äußeren RACE-PCR wurden so analysiert, dass man auf dem Agarosegel jeweils auf der linken Seite das PCR-Produkt der RACE-Reaktion (R) und auf der rechten Seite das Produkt der genspezifischen Primer (K) sieht (Abbildung 3.14). Nach der äußeren RACE-PCR ließen sich in den beiden untersuchten Geweben aus 5 Tage und 7 Tage alten Keimlingen noch keine RACE-Produkte mit den adapterarmspezifischen Primern identifizieren. Die untersuchten Kürbisproben 5d und 7d zeigten mehrere

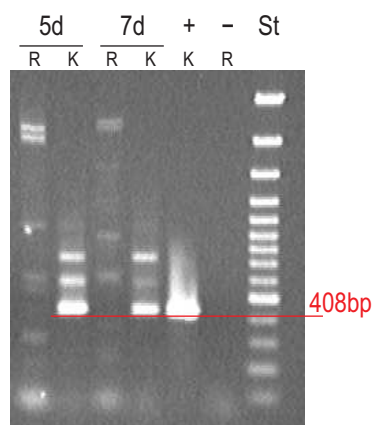


Abbildung 3.14: Isolierung des 3'-Endes von *CmCRE1* mit der RLM-RACE-Methode – äußere PCR.

**St:** 100bp-Standard. Die Gesamt-RNA entstammte unterschiedlichen Geweben: **5d:** Spross 5 Tage alter Kürbiskeimlinge; **7d:** Kotyledonen 7 Tage alter Kürbiskeimlinge. **R:** RACE-Reaktion mit adapterarmspezifischem Primer; **K:** Kontrollreaktion mit genspezifischen Primern. Die Primerkombination ist in Abbildung 2.3 A beschrieben. **+**: Klon 276 (10pg Plasmid-DNA) als PCR-Positivkontrolle; **-**: PCR-Negativkontrolle ohne Template.

### 3 Ergebnisse

schwache Banden, von denen keine dem Gen *CmCRE1* zugeordnet werden konnte, da dessen Größe unbekannt war. In den Kontrollreaktionen wurde mit den genspezifischen Primern eine Bande amplifiziert, die der erwarteten Größe von 408bp entsprach (vergleiche mit Abbildung 2.3) und auch mit der Plasmid-DNA des Klons 276 als Template (PCR-Positivkontrolle) amplifiziert wurde.

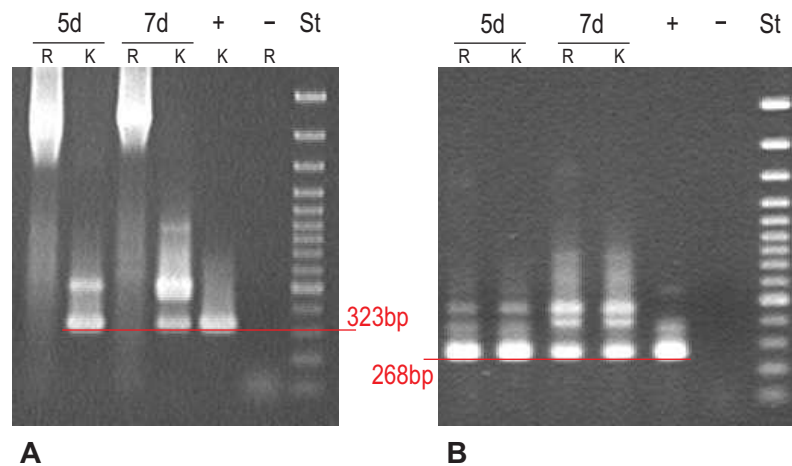


Abbildung 3.15: Isolierung des 3'-Endes von *CmCRE1* mit der RLM-RACE-Methode.

**(A)** innere PCR: Als Template diente das jeweilige PCR-Produkt der vorangegangenen äußeren PCR. Primerkombination s. Abbildung 2.3 B. **R:** RACE-Reaktion mit adapterarmspezifischem Primer; **K:** Kontrollreaktion mit genspezifischen Primern. **(B)** Kontroll-PCR: Es diente jeweils die RACE-Reaktion (R) und die Kontroll-Reaktion (K) der inneren PCR als Template. Primerkombination s. Abbildung 2.3 C. **St:** 100bp-Standard. **5d:** Spross 5 Tage alter Kürbiskeimlinge; **7d:** Kotyledonen 7 Tage alter Kürbiskeimlinge; **+**: Klon 276 (10pg Plasmid-DNA) als PCR-Positivkontrolle; **-:** PCR-Negativkontrolle ohne Template.

Für die innere RACE-PCR diente jeweils das RACE-Produkt der äußeren RACE-PCR als Template. Auf dem Elektrophoresegel wurde jeweils auf der linken Seite das PCR-Produkt der inneren RACE-Reaktion (R) und auf der rechten Seite das Produkt der genspezifischen Primer (K) aufgetragen (Abbildung 3.15). Die Kontrollreaktionen zeigten auch hier die erwartete Größe von 323bp (vergleiche mit Abbildung 2.3 B). In den RACE-Reaktionen war ein sehr starkes Signal in dem Bereich zwischen 2 und 3kbp sichtbar. Allerdings war die Färbung zu stark, um sagen zu können, ob es sich um eine oder mehrere Banden handelte. Das Produkt der inneren RACE-PCR wurde in einer dritten verschachtelten Reaktion noch einmal mit einem weiteren Set genspezifischer Primer

### 3.3 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR

amplifiziert (vergleiche mit Abbildung 2.3 C), um zu zeigen, dass das gesuchte Gen in den RACE-Produkten der inneren PCR enthalten war. In beiden Proben (5d und 7d) wurde das Kontrollfragment mit einer Größe von 268bp amplifiziert (Abbildung 3.15 B).

#### 3.3.2 Isolierung und Klonierung der RACE-Produkte

In einem präparativen Ansatz der optimierten inneren RACE-PCR wurden jeweils drei Doppelbanden amplifiziert (Banden 1, 2 und 3 in Abbildung 3.16) die einzeln kloniert wurden. Dadurch entstanden sechs Transformationsansätze. Im nachfolgenden PCR-Kolonie-'Screening' mit den genspezifischen Primern CRE1-forw2 und CRE1-kontrollRP zeigten einige der Klone ein PCR-Fragment von 268bp (vergleiche mit Abbildung 2.3 C). In dem Ansatz mit der Bande 2 aus der Probe 7d kam es statt dessen bei einigen Kolonien zur Amplifizierung einer Bande von etwa 400bp Größe statt der kleineren von 268bp. Je ein Klon mit 268bp-Insert (Klon 3 aus der Probe 5d) und einer mit 400bp-Insert (Klon 11 aus Probe 7d) wurde in einer M13-PCR auf ihre Insertgröße untersucht. Dabei wurde mit Klon 3 ein Insert von etwa 2 500bp und mit Klon 11 eines von ca. 2 700bp amplifiziert. Beide Klone wurden mit M13-Primern, CRE1Seq-FP4, CRE1Seq-FP5, CRE1Seq-FP6, CRE1Seq-RP4, CRE1Seq-RP5, CRE1Seq-RP6 von beiden Seiten durchsequenziert und miteinander abgeglichen. Sie zeigten sich untereinander nahezu identisch. Die Länge der Inserts innerhalb der TA-Klonierungsregion des Plasmides pCR2.1-TOPO betrug bei Klon 3 2 211bp und bei Klon 11 2 359bp. Die Sequenz der beiden Klone unterschied sich am 5'-Ende um 14bp. Außerdem zeigt Klon 11 einen Einschub von 137bp an der Position 2 040 seiner Nukleotidsequenz.

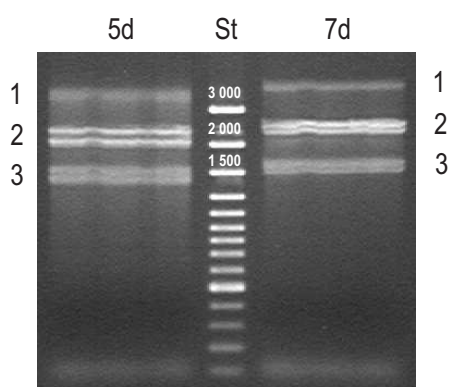


Abbildung 3.16: Optimierte innere PCR zur Isolierung und Klonierung der RACE-Produkte.

**5d:** Spross 5 Tage alter Keimlinge; **7d:** Kotyledonen 7 Tage alter Keimlinge.

### 3.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse von *CmCRE1*

*CmCRE1* lag zu diesem Zeitpunkt noch nicht als vollständiges Gen in einem Vektor vor. Daher wurde die Sequenz anhand der identischen Klone 276 und H1 (3'-Ende; Abschnitt 3.2) sowie der Klone 3 und 11 (5'-Ende; Abschnitt 3.3) ermittelt. Die Klone 3 und 11 zeigten eine etwa 400bp große Überschneidung mit den Klonen 276 und H1. Diese basierte auf der Wahl des genspezifischen Primers CRE1-reverse in der inneren RACE-PCR (Abbildung 2.3). Aus den Sequenzanalysen der Klone 276 und 3 wurde eine Gensequenz kombiniert, die eine Gesamtlänge von 3 925bp aufwies. Innerhalb dieser Sequenz konnte ein offener Leserahmen (ORF) von 2 943bp identifiziert werden, der in Position 589 mit dem Startcodon ATG beginnt und in Position 3 532 mit TAG als Stopcodon endet. Das Gen codiert für ein Protein mit 981 Aminosäuren Länge und wurde *CmCRE1* ('*Cucurbita maxima* Cytokinin Response 1'; GAN: AJ628045) genannt.

Tabelle 3.2: Homologievergleich von *CmCRE1* mit Histidin-Kinasen anderer Spezies basierend auf der vorhergesagten Aminosäuresequenz.

**AHK:** *Arabidopsis* Histidin-Kinase; **ZmHK:** *Zea mays* Histidin-Kinase; **CrCKR:** *Catharanthus roseus* Cytokinin-Kinase-Rezeptor.

CmCRE1 verglichen mit:	GAN	Identität	Ähnlichkeit
AHK4	AB046871	70%	80%
ZmHK1	AB042270	57%	72%
AHK3	AB046870	57%	72%
AHK2	AB046869	54%	69%
CrCKR1	AY092025	52%	68%

Im Sequenzvergleich wurde eine 80%ige Ähnlichkeit zu CRE1/AHK4 aus *A. thaliana* festgestellt. Auch die CRE1/AHK4-Homologen ZmHK1 aus *Z. mays* und CrCKR1 aus *C. roseus* wiesen 72% bzw. 68% Ähnlichkeit auf. Anhand der Homologien mit den in Tabelle 3.2 aufgeführten Genen konnten die Strukturen sowie die voraussichtlichen Funktionen der einzelnen Domänen von *CmCRE1* ermittelt werden (Abbildung 3.17). *CmCRE1* hat zwei Transmembran-Domänen und eine extrazelluläre CHASE-Domäne. Auf der cyto-



### 3.4 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

solischen Seite ist eine Histidin-Kinase-Domäne mit phosphorylierbarem Histidinrest und den konservierten Boxen H, N, G1, F, G2 zu finden, außerdem eine empfängerähnliche Domäne und eine Empfänger-Domäne mit phosphorylierbarem Aspartatrest. Die Sequenzierung des Klons 11 führte zu einer Variante des Gens *CmCRE1* mit einer eingeschobenen Sequenz von 137bp-Länge, die an Position 1 422 den offenen Leserahmen von *CmCRE1* unterbricht. Diese Variante mit Intron ist unter der GAN AJ630372 abgelegt.

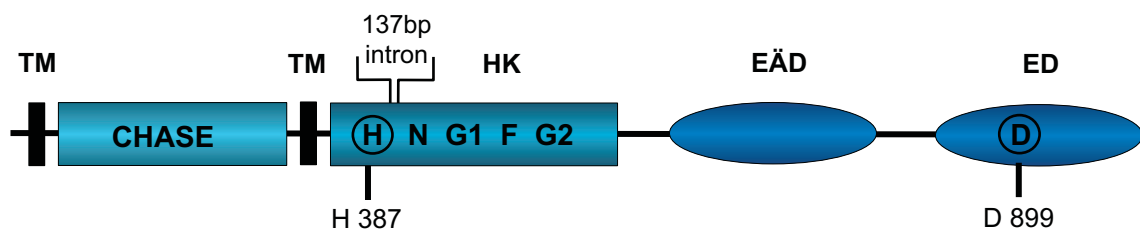


Abbildung 3.17: Strukturanalyse der Domänen von *CmCRE1*.

**TM:** Transmembran-Domäne; **HK:** Histidin-Kinase-Domäne; **EÄD:** empfängerähnliche Domäne; **ED:** Empfänger-Domäne; **CHASE:** cyclases/histidine-kinase-associated sensory extracellular (mutmaßliche Domäne für die Bindung von Hormonen mit geringer molekularer Masse – ANANTHARAMAN U. ARAVIND, 2001); **H, N, G1, F, G2:** stark konservierte Boxen in der HK-Domäne. Die phosphorylierbaren Aminosäuren sind eingekreist: **H:** Histidin an Position 387 und **D:** Aspartat an Position 899. Eine Splicing-Variante enthält ein Intron von 137bp Länge an Position 474.

## 3.4 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

Die funktionelle Expression in dem Hefestamm *sln1Δ* erbrachte den Nachweis, dass *CmCRE1* als Rezeptor für verschiedene Cytokinine fungiert. Die verwendete Hefemutante *sln1Δ* ist in dem Gen *SLN1*, das für einen Osmosensor codiert, defizient. Ohne dieses Gen ist der Hefestamm letal auf Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Diese Letalität wurde aufgehoben, indem *SLN1* durch das heterologe Gen *CmCRE1* ersetzt und Cytokinin als Ligand hinzugefügt wurde. Durch die Zugabe verschiedener Pflanzenhormone wurde die Ligandenspezifität und die Sensitivität von *CmCRE1* bestimmt.

### 3.4.1 Klonierung von *CmCRE1* in den Hefvektor p413TEF

Nach der Transformation in *E. coli*-XL10-Gold wurden 69 Einzelkolonien identifiziert. Sie wurden zu Gruppen zusammengefasst und im PCR-Kolonie-'Screening' auf das einklonierte Konstrukt hin überprüft. Die Primer CRE1Seq-FP und CRE1Seq-RP generierten ein DNA-Fragment von 1 091bp Größe welches in fünf der 14 untersuchten Gruppen amplifiziert wurde (Abbildung 3.18 A). Die in den positiven Gruppen C, D, H, L und O enthaltenen Kolonien wurden in einem weiteren Kolonie-'Screening' mit derselben Primer-Kombination noch einmal einzeln untersucht (Abbildung 3.18 B). Dabei zeigten die sechs Einzelkolonien 11, 12, 20, 39, 55 und 66 die erwartete Bande von 1 091bp.

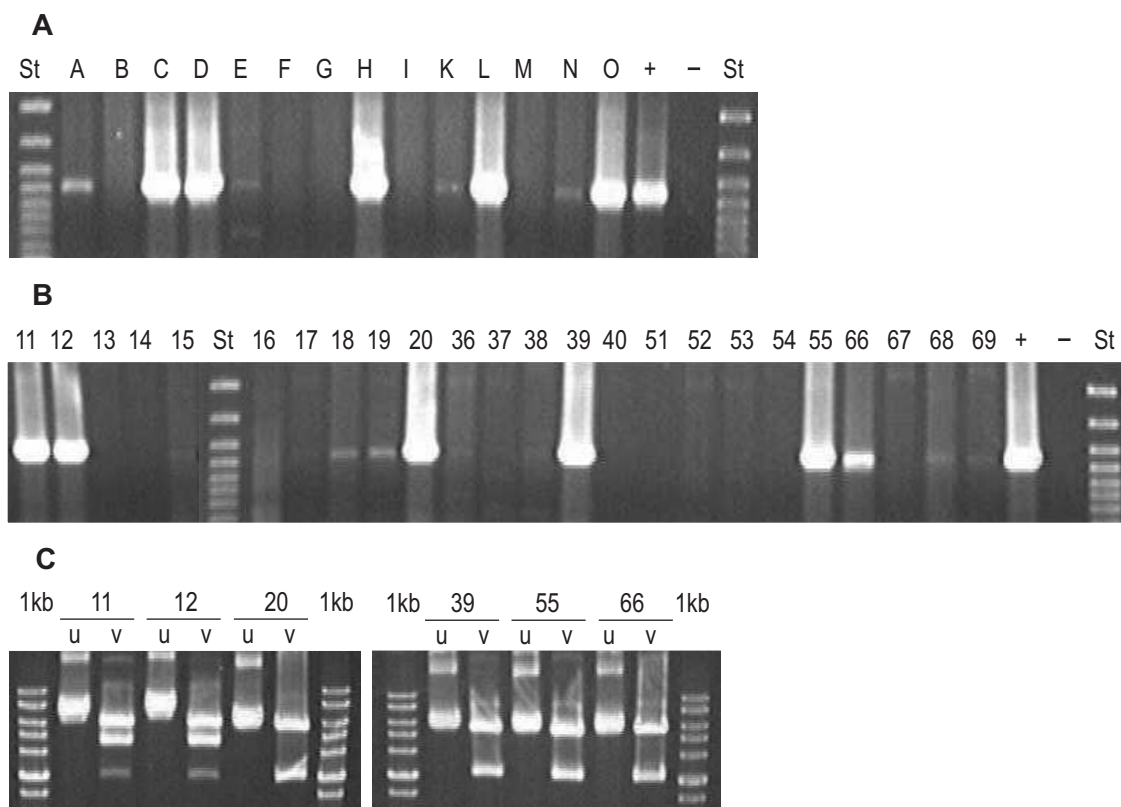


Abbildung 3.18: Isolierung der transformierten *E. coli*-Zellen und Identifizierung des klonierten Konstruktes.

**(A)** PCR-Kolonie-'Screening' der Gruppen A – O. **(B)** PCR-Kolonie-'Screening' der Einzelkolonien. **(C)** Überprüfung der positiven Einzelkolonien im Restriktionsverdau. **St:** 100bp-Standard; **+**: Klon 276 (10pg Plasmid-DNA) als PCR-Positivkontrolle; **-**: PCR-Negativkontrolle ohne Template. **1kb:** 1kb-Standard; **u:** unverdaut; **v:** Doppelverdau mit *Xba*I und *Xho*I.

### 3.4 Funktionelle Expression von CmCRE1 im Hefe-Komplementierungstest

In beiden Reaktionen wurden in weiteren Proben schwache Signale der gleichen Größe erzeugt, die aber aufgrund der geringen Intensität als nicht als positiv betrachtet wurden. Die Plasmide der sechs positiven Einzelkolonien wurden einem Verdau mit den beiden Enzymen *Xba*I und *Xho*I unterzogen, mit denen das Gen in den Vektor p413TEF inkloniert worden war. Die Enzyme schnitten aus allen sechs Konstrukten ein etwa 3 000bp großes Fragment heraus (Abbildung 3.18 C). Das inklonierte PCR-Produkt hatte eine Größe von 3 053bp. In der Gelelektrophorese wurde deutlich, dass die herausgeschnittene 3 000bp-Bande in den Proben mit den Klonen 11 und 12 sehr schwach ausgeprägt war und eine weitere Bande von ungefähr 4 500bp erschien. Da die gesuchte Fragmentgröße aber in allen sechs Proben zu sehen war, wurden die Plasmide der Kolonien 11, 12, 20, 39, 55 und 66 vereinigt und als CmCRE1 für die Transformation in die Hefemutante *sln1Δ* eingesetzt.

#### 3.4.2 Transformation in den Hefestamm *sln1Δ*

Der Stamm *sln1Δ* ist prototroph für Tryptophan und Uracil. Nach erfolgreicher Transformation kam eine Prototrophie für Histidin hinzu, da dieses Merkmal auf dem Plasmid p413TEF lag. Auf diese Weise wuchsen nur Hefezellen auf Galactose, die zuvor mit p413TEF transformiert worden waren. Vorangegangene Testtransformationen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass CRE1/AHK4 auch in dem Vektor p413TEF in der Lage war, *sln1Δ* zu vervollständigen (Ergebnisse nicht abgebildet) und wurde deshalb als Positivkontrolle verwendet.

Tabelle 3.3: Auszählung der ausplattierten Transformationsansätze.

**+**: Wachstum von Zellkolonien; **–**: kein Wachstum. **Gal**: 2% Galactose; **Glc**: 2% Glucose; ***t*-Zeatin**: *trans*-Zeatin ( $10^{-5}$ M).

Zusätze zum CM-Dropout-Medium (–His, –Trp, –Ura):	Anzahl der ausplattierten Kolonien		
	+ Gal – <i>t</i> -Zeatin	+ Glc – <i>t</i> -Zeatin	+ Glc + <i>t</i> -Zeatin
<b>Transformationsansatz:</b>			
AHK4	0	0	200
CmCRE1	0	0	7

### 3 Ergebnisse

In den beiden durchgeführten Transformationsansätzen mit CmCRE1 und CRE1/AHK4 konnten keine Kolonien auf dem CM-Minimalmedium mit Galactose gezählt werden (Tabelle 3.3). Auch auf den Glucoseplatten ohne *t*-Zeatin wuchsen in den beiden Transformationsansätzen keine Kolonien. Auf den CM-Platten mit Glucose und *t*-Zeatin dagegen konnten Kolonien identifiziert werden. Die Transformation mit CRE1/AHK4 zeigte etwa 200 Kolonien in 400  $\mu$ l ausplattiertem Transformationsansatz. Die Transformation mit CmCRE1 dagegen wies nur sieben Kolonien in etwa 1 600  $\mu$ l Transformationsansatz auf. Diese Kolonien wurden CmCRE1-1 bis CmCRE1-7 genannt und noch einmal auf CM-Dropout-Medium mit Galactose oder Glucose ausgestrichen. Die Galactose in dem Selektionsmedium ohne Histidin, Tryptophan und Uracil ermöglichte den untersuchten Klonen ein normales Wachstum (Abbildung 3.19). In dem glucosehaltigen Medium waren sie letal. Durch die Zugabe von  $10^{-5}$ M *t*-Zeatin zeigten die Hefezelle jedoch wie auf den Galactoseplatten deutliches Wachstum.

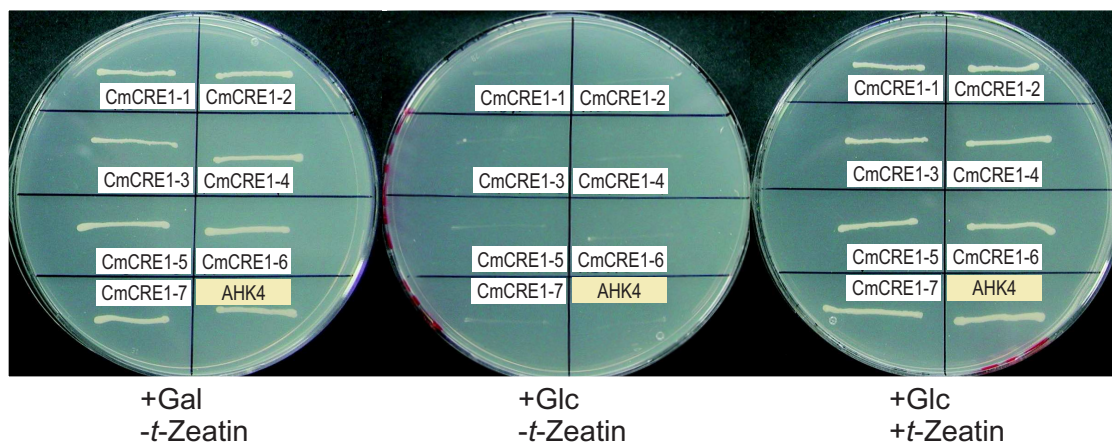


Abbildung 3.19: Wachstumsverhalten der positiven Klone aus der Hefetransformation.

**CmCRE1-1 bis CmCRE1-7:** Sieben isolierte Hefe-Klone aus der Transformation mit *CmCRE1*. **AHK4:** Isolierter Hefe-Klon aus der Transformation mit *CRE1/AHK4*. Ausplattiert auf CM-Dropout-Medium -His, -Trp, -Ura; versetzt mit **Gal:** 2% Galactose, **Glc:** 2% Glucose, mit oder ohne *t*-Zeatin ( $10^{-5}$ M).

### 3.4.3 Charakterisierung von CmCRE1 mit verschiedenen Pflanzenhormonen

Zur Charakterisierung der transformierten Hefeklone wurde untersucht, welche Pflanzenhormone und insbesondere welche Cytokinine zu einem Wachstum der Hefezellen auf Glucosemedium führten. Bei diesen Wachstumstests wurde deutlich, dass sich die Transformanten CmCRE1-1 bis CmCRE1-7 in ihrem Wachstumsverhalten in zwei Gruppen spalteten (vergleiche Abbildungen 3.21 bis 3.23). Daher wird im weiteren Verlauf nur jeweils ein Vertreter dargestellt. CmCRE1-2, CmCRE1-4 und CmCRE1-6 verhielten sich wie CmCRE1-1 wogegen CmCRE1-3 und CmCRE1-5 das gleiche Muster zeigten wie CmCRE1-7.

#### Hormonabhängiges Wachstum

Das Wachstumsverhalten von *sln1Δ*, in denen CRE1/AHK4 oder CmCRE1 die defekte Histidin-Kinase SLN1 ersetzen, wurde in Abhängigkeit von unterschiedlichen Pflanzenhormonklassen untersucht (Abbildung 3.20). Dabei zeigte sich, dass auf glucosehaltigen CM-Minimal-Platten nur das Cytokinin *t*-Zeatin ein Wachstum der Kolonien ermöglichte. Die Zugabe anderer Hormone, wie Gibberellin A<sub>3</sub>, 24-Epibrassinolid (Brassinosteroid), Indol-3-Essigsäure (Auxin) oder Abscisinsäure führte nicht zu einem Zellwachstum.

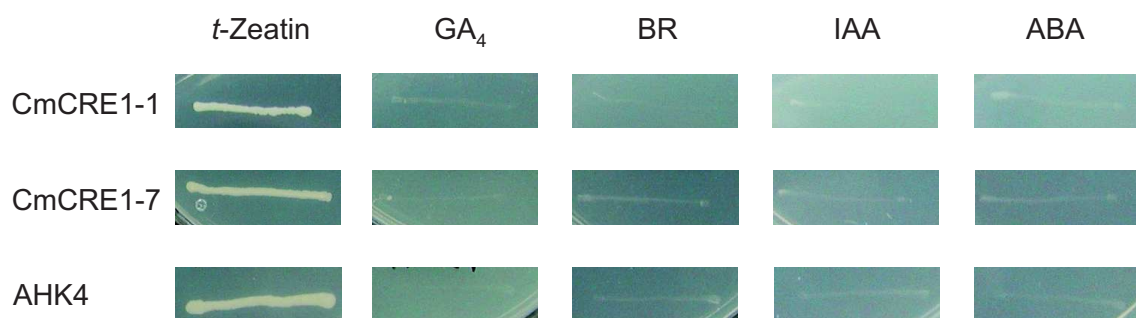


Abbildung 3.20: Wachstum von *sln1Δ* mit einklonierten Histidin-Kinasen in Abhängigkeit von verschiedenen Pflanzenhormonen.

*sln1Δ* wurde mit *CmCRE1* oder *CRE1/AHK4* transformiert. Die Transformanten CmCRE1-1, CmCRE1-7 und AHK4 wurden auf CM-Minimalmedium mit 2% Glucose und verschiedenen Pflanzenhormonen ausgestrichen (je 10<sup>-5</sup>M). **GA<sub>4</sub>**: Gibberellin A<sub>4</sub>, **BR**: 24-Epibrassinolid, **IAA**: Indol-3-Essigsäure, **ABA**: Abscisinsäure.

### 3 Ergebnisse

#### Wachstum auf verschiedenen Cytokininen

Bereits durch das Ausstreichen der Transformationsansätze (Abbildung 3.19) war deutlich geworden, dass die untersuchten Transformanden CmCRE1-1 bis CmCRE1-7 und AHK4 nur auf CM-Minimalplatten mit Glucose wuchsen, wenn das Cytokinin *t*-Zeatin zugegeben wurde. Wurde *t*-Zeatin durch andere Cytokinine ausgetauscht, änderte sich teilweise das Wachstumsverhalten (Abbildung 3.21). Auf Platten, die mit Benzyladenin oder Isopentenyladenin versetzt worden waren, wurde bei den untersuchten Klonen ein deutliches Wachstum nachgewiesen, ebenso wie auf den *t*-Zeatin-Platten. Auf kinetin-haltigen Platten wuchs CmCRE1-1 überhaupt nicht und AHK4 nur sehr schlecht. Der Transformand CmCRE1-7 zeigte jedoch ein ebenso deutliches Wachstum auf Kinetin wie auf allen anderen Cytokinin-Platten.

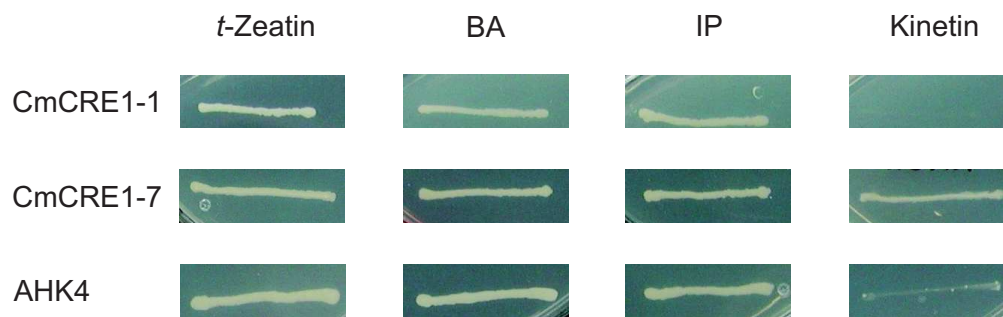


Abbildung 3.21: Cytokininabhängiges Wachstum von *sln1Δ* mit einklonierten Histidin-Kinasen.

*sln1Δ* wurde mit *CmCRE1* oder *CRE1/AHK4* transformiert. Die Transformanden CmCRE1-1, CmCRE1-7 und AHK4 wurden auf CM-Minimalmedium mit 2% Glucose und verschiedenen Cytokininen ausgestrichen (je  $10^{-5}$ M). **BA**: Benzyladenin, **IP**: Isopentenyladenin.

#### Wachstum in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kinetin-Konzentrationen

Wurden die Transformanden CmCRE1-1, CmCRE1-7 und AHK4 auf CM-Minimalmedium mit unterschiedlichen Kinetin-Konzentrationen ausplattiert, zeigten sich konzentrationsbedingte Unterschiede im Wachstumsverhalten (Abbildung 3.22). Bei einer Kinetin-Konzentration von  $10^{-6}$ M war bei keinem der untersuchten Klone ein eindeutiges Wachstum zu erkennen. Ein Gehalt von  $10^{-5}$ M führte bei CmCRE1-7 und AHK4 zu einem schwachen Zellwachstum, CmCRE1-1 wuchs dagegen nicht. Erst bei einer Zugabe von

### 3.4 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

$10^{-4}$ M Kinetin zeigte *CmCRE1*-1 schwaches Zellwachstum, wohingegen *CmCRE1*-7 und *AHK4* bei dieser Konzentration sehr deutlich wuchsen.

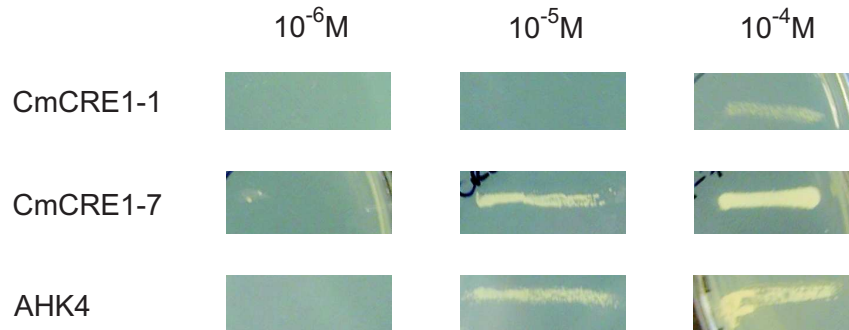


Abbildung 3.22: Wachstum von *sln1Δ* mit einklonierten Histidin-Kinasen in Abhängigkeit von der Kinetin-Konzentration.

*sln1Δ* wurde mit *CmCRE1* oder *CRE1/AHK4* transformiert. Die Transformanten *CmCRE1*-1, *CmCRE1*-7 und *AHK4* wurden auf CM-Minimalmedium mit 2% Glucose und Kinetin in unterschiedlichen Konzentrationen ausgestrichen.

#### Wachstum in Abhängigkeit von unterschiedlichen *t*-Zeatin-Konzentrationen

Unterschiedliche *t*-Zeatin-Konzentrationen führten ebenfalls zu Variationen im Wachstumsverhalten der drei Transformanten *CmCRE1*-1, *CmCRE1*-7 und *AHK4* auf CM-Minimalmedium mit Glucose (Abbildung 3.23). Bei einer Konzentration von  $10^{-7}$ M und geringer war weder bei *CmCRE1*-1, noch bei *CmCRE1*-7 oder *AHK4* ein Zellwachstum

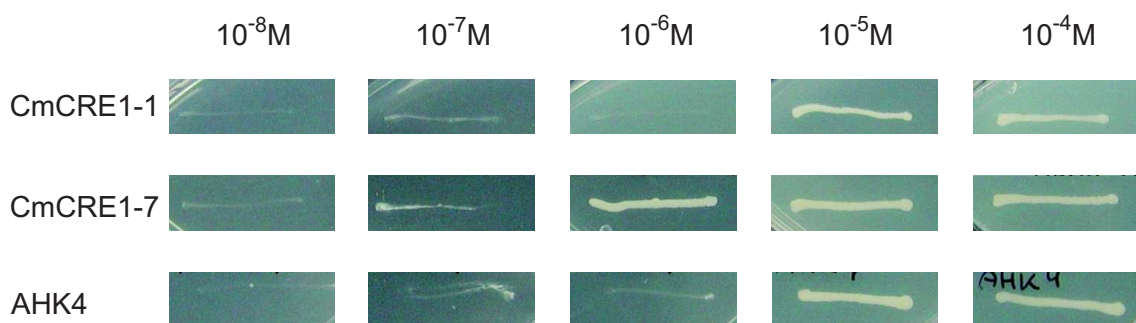


Abbildung 3.23: Wachstum von *sln1Δ* mit einklonierten Histidin-Kinasen in Abhängigkeit von der *t*-Zeatin-Konzentration.

*sln1Δ* wurde mit *CmCRE1* oder *CRE1/AHK4* transformiert. Die Transformanten *CmCRE1*-1, *CmCRE1*-7 und *AHK4* wurden auf CM-Minimalmedium mit 2% Glucose und *t*-Zeatin in unterschiedlichen Konzentrationen ausgestrichen.



### 3 Ergebnisse

zu erkennen. Bei einer Zugabe von  $10^{-6}\text{M}$  *t*-Zeatin zeigte nur CmCRE1-7 ein deutliches Wachstum, die beiden Transformanden CmCRE1-1 und AHK4 wuchsen dagegen nicht. Die *t*-Zeatin-Konzentrationen  $10^{-5}\text{M}$  und  $10^{-4}\text{M}$  dagegen führten in allen drei Fällen zu einem ausgeprägten Zellwachstum.

#### 3.4.4 Sequenz- und Strukturanalyse der transformierten Hefeklone

Eine PCR zur Überprüfung der Identität der Klone CmCRE1-1 und CmCRE1-7 führte zur Amplifizierung eines ca. 3 000bp großen DNA-Fragmentes mit den genspezifischen Primern (Abbildung 3.24 A). Das entspricht der Größe des inklonierten Gens *CmCRE1*. Die Hefe, die mit *CRE1/AHK4* transformiert wurde (Klon AHK4), zeigte dagegen keine DNA-Bande, da *CRE1/AHK4* keine homologen Bereiche für die genspezifischen Primer von *CmCRE1* aufweist. Die plasmidspezifischen Primer p413TEFfor2 und p413TEFrev binden in dem Plasmid p413TEF und amplifizierten daher in allen Proben das einligierte Gen und zusätzlich 192bp des Plasmids (Abbildung 3.24 B). Dabei wurde deutlich, dass das Signal des Klons AHK4 mit etwa 3,5kbp etwas größer ausfiel als bei den Proben, die das Gen *CmCRE1* enthielten.

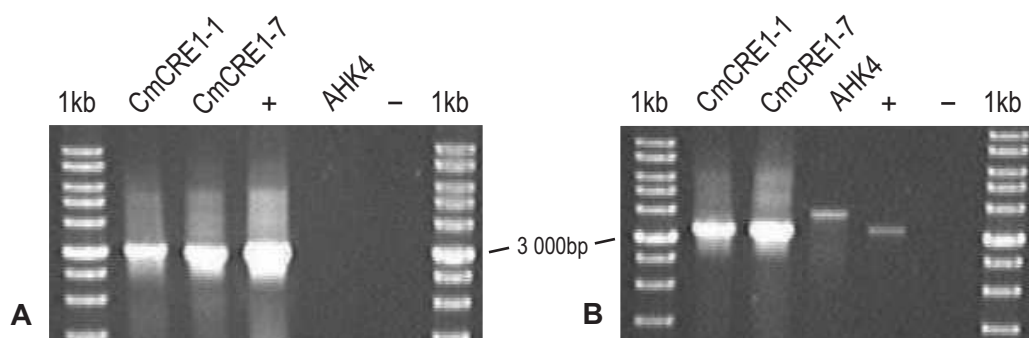


Abbildung 3.24: Untersuchung der transformierten Hefezellen mittels PCR-Kolonie-  
'Screening'.

**(A)** PCR mit den genspezifischen Primern CRE1-FP0a und CRE1-RP0. **(B)** PCR mit den plasmidspezifischen Primern p413TEFfor2 und p413TEFrev. Untersucht wurde Koloniematerial der Klone CmCRE1-1, CmCRE1-7 und AHK4. +: Positivkontrolle mit Klon 276 als Template (100pg Plasmid); -: Negativkontrolle ohne Template.



### 3.4 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

Tabelle 3.4: Unterschiede in der Sequenz des Hefeklons *CmCRE1-1* zu *CmCRE1*.

Die Positionen bezeichnen die betroffenen Nukleotide in der Sequenz in Anhang D. **1.TM**: 1. Transmembran-Domäne; **CHASE**: Liganden-Bindedomäne **HK**: Histidin-Kinase-Domäne; **ED**: Empfänger-Domäne. Vergleiche mit Abbildung 3.17

Position	Domäne	Unterschied in der Nukleotidsequenz	Unterschied in der Proteinsequenz
715	–	A statt T	Lysin statt Methionin
764	1.TM	C statt T	keine Änderung
1 373	CHASE	C statt T	keine Änderung
1 712	HK	T statt C	keine Änderung
1 927	HK	A statt T	Glycin statt Leucin
2 196	HK	G statt A	Valin statt Isoleucin
2 501	HK (Box G2)	C statt T	keine Änderung
3 227	ED	G statt C	keine Änderung

Die beiden mit *CmCRE1* transformierten Klone *CmCRE1-1* und *CmCRE1-7* wichen im Hefe-Komplementierungstest im Wachstumsverhalten voneinander ab (Abschnitt 3.4.3), weshalb beide Klone sequenziert wurden. Sowohl *CmCRE1-1* als auch *CmCRE1-7* weisen eine Reihe von Punktmutationen auf, durch die sie in einzelnen Basen von der Nukleotidsequenz von *CmCRE1* abweichen (Tabellen 3.4 und 3.5). Dem Klon *CmCRE1-7* fehlt zusätzlich an der Position 3 504 ein ganzes Triplet (AAG), was in dem Verlust der Aminosäure Lysin 10 Aminosäuren vor dem Stopcodon mündet.

Tabelle 3.5: Unterschiede in der Sequenz des Hefeklons *CmCRE1-7* zu *CmCRE1*.

Die Positionen bezeichnen die betroffenen Nukleotide in der Sequenz in Anhang D. **HK**: Histidin-Kinase-Domäne; **ED**: Empfänger-Domäne. Vergleiche mit Abbildung 3.17

Position	Domäne	Unterschied in der Nukleotidsequenz	Unterschied in der Proteinsequenz
2 026	HK	C statt T	Arginin statt Valin
2 492	HK (Box G2)	C statt T	keine Änderung
2 778	–	G statt A	Valin statt Methionin
2 909	–	C statt G	Cystein statt Tryptophan
3 244	ED	G statt A	Arginin statt Lysin
3 504	ED	AAG fehlt	Lysin fehlt (Deletion)

### 3.5 Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR

In der kompetitiven RT-PCR wurden unterschiedliche Mengen internen RNA-Standards in parallel durchgeführten Ansätzen verwendet, so dass man in der anschließenden Agarosegelelektrophorese DNA-Banden unterschiedlicher Intensitäten ausmachen konnte (Originalbilder und Einzelwerte stehen in Anhang E). Nachdem diese DNA-Banden mit Hilfe des Programms 'Scion Image' quantifiziert worden waren, ließ sich in allen Versuchsansätzen eine recht gleichmäßige Verteilung der Transkriptgehalte in den untersuchten Geweben feststellen.

#### Die Expression von *CmCRE1* in sich entwickelnden Kürbiskeimlingen

Die Expression von *CmCRE1* in sich entwickelnden Kürbiskeimlingen wurde in Spross und Wurzelgewebe der Keimlinge im Alter zwischen 2 und 5 Tagen untersucht (Abbildung 3.25). Dabei wurde in dem zwei Tage alten Keimling ein Wert von 9,1pg Transkript/ $\mu$ g Gesamt-RNA ermittelt (Einzelmessung). Die 3 bis 5 Tage alten Keimlinge zeigten Transkriptgehalte, die im Mittel zwischen 9,3 und 10,0pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA in den Sprossgeweben und zwischen 10,4 und 12,3pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA in den Wurzelgeweben lagen.

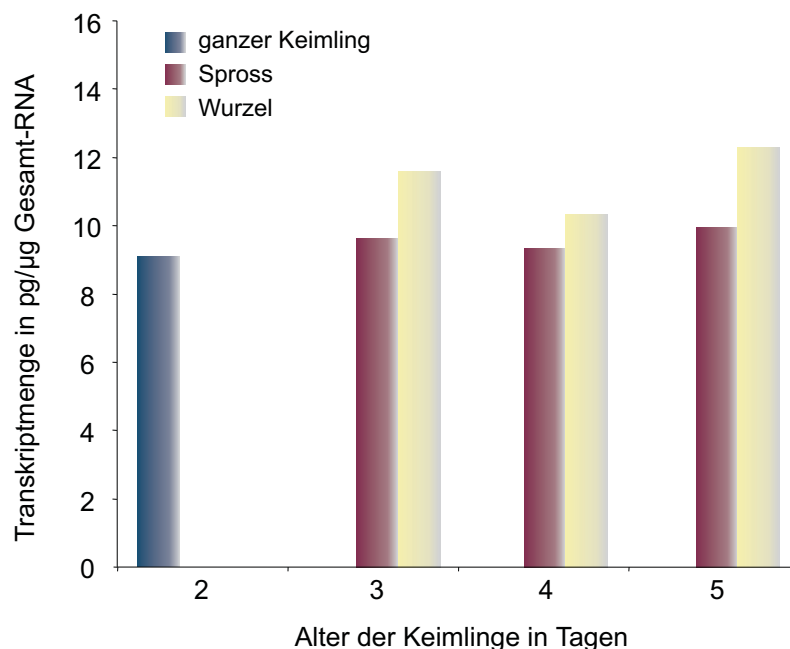


Abbildung 3.25: Die Expression von *CmCRE1* in sich entwickelnden Kürbiskeimlingen im Alter von 2 bis 5 Tagen (Doppelmessungen).

#### Die Expression von *CmCRE1* in Abhängigkeit exogen applizierter Cytokinine

Im Alter von 5 Tagen wurden die Keimlinge auf ihre Expression von *CmCRE1* in Abhängigkeit von der Behandlung mit den Cytokinen *t*-Zeatin und Kinetin untersucht (Abbildung 3.26). Die unbehandelte Kontrollprobe (Nährlösung) enthielt im untersuchten Sprossgewebe 8,5pg Transkript/ $\mu$ g Gesamt-RNA. In den beiden Cytokinin-behandelten Proben lagen die Werte etwas darunter, wiesen aber mit 6,6pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA (Kinetin) bzw. 6,8pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA (*t*-Zeatin) untereinander sehr ähnliche Werte auf. Die Transkriptgehalte in den Wurzelgeweben lagen bei dieser Untersuchung allgemein geringfügig höher als die Werte in den Sprossen. In der unbehandelten Kontrollprobe wurden 13,3pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA ermittelt, in den Cytokinin-behandelten Proben lagen die Werte bei 11,3 respektive 10,9pg Transkript.

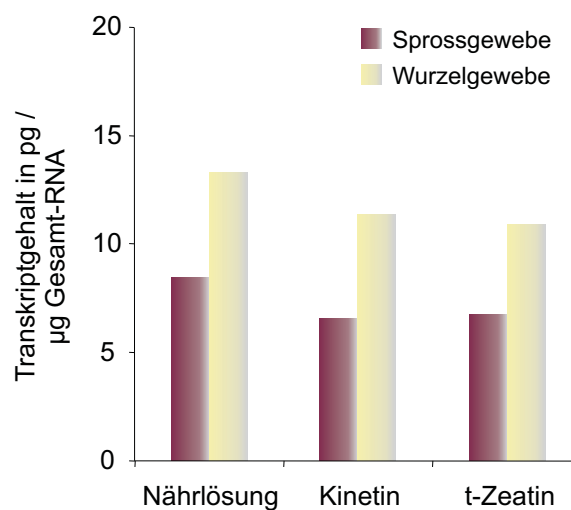


Abbildung 3.26: Die Expression von *CmCRE1* in 5 Tage alten Keimlingen in Abhängigkeit exogen applizierter Cytokinine ( $10^{-6}$ M). (Sprossgewebe: Doppelmessung; Wurzelgewebe: Dreifachmessung)

#### Die lichtabhängige Expression von *CmCRE1*

Die Untersuchung in 5 Tage alten Keimlingen wurde noch einmal mit einer feineren Unterteilung in die fünf Kompartimente Wurzelspitzen, Wurzelrest, Hypokotyl, Kotyledonen und Apikalspitze wiederholt. Auch hier ergab sich mit Werten zwischen 8,8 und 11,0pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA eine sehr gleichmäßige Verteilung des Transkriptes in den unter Langtagbedingungen angezogenen Keimlingen (Abbildung 3.27). Die etiolierten Keim-

### 3 Ergebnisse

linge zeigten in den Kompartimenten Wurzelspitzen, Wurzelrest, Hypokotyl und Apikalspitze etwas geringere Transkriptgehalte, die zwischen 7,6 und 9,3pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA lagen. Nur in den Kotyledonen der etiolierten Pflanzen wurde ein deutlich niedriger Wert von 5,7pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA gemessen.

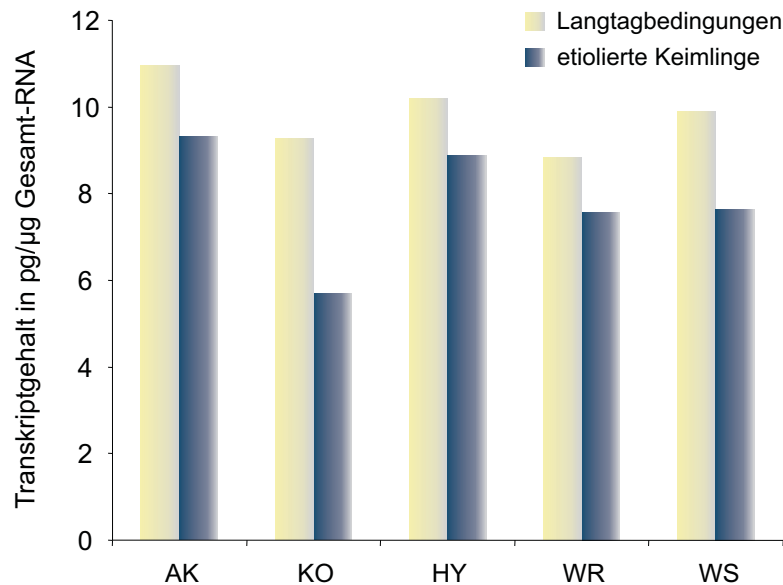


Abbildung 3.27: Die lichtabhängige Expression von *CmCRE1* in fünf Tage alten Kürbiskeimlingen.

**AK:** Apikalspitze mit Folgeblättern; **KO:** Kotyledonen; **HY:** Hypokotyl; **WR:** Wurzelrest; **WS:** Wurzelspitze. (Einzelmessungen)

## 4 Diskussion

Zwei-Komponentensysteme stellen eine weit verbreitete und vielseitig erforschte Rezeptorklasse im Reich der Prokaryonten und eukaryotischen Einzeller dar (STOCK ET AL. 2000). Auch in verschiedenen Höheren Pflanzen wurden Elemente dieser Systeme isoliert, wobei es sich in vielen Fällen um die sensorischen Histidin-Kinasen handelt (WILKINSON ET AL. 1995, HAN ET AL. 2004, PAPON ET AL. 2004). In *Zea mays* wurden daneben auch Phosphotransferproteine und 'Response Regulatoren' entdeckt und im Zusammenhang mit Cytokinin analysiert (ASAKURA ET AL. 2003, YONEKURA-SAKAKIBARA ET AL. 2004). Am umfassendsten ist das Bild der Zwei-Komponentensysteme jedoch in *A. thaliana*. Aufgrund der vollständigen Kenntnis des Genoms konnten alle Elemente identifiziert werden und die Aufschlüsselung ihrer Funktion im Ethylen- und Cytokinin-Signaltransduktionsweg schreitet stetig weiter voran (GREFEN U. HARTER 2004). Darüber hinaus gibt es allerdings nur wenige Spezies, die an der Erforschung des Zwei-Komponentensystems beteiligt sind. Gerade cytokinininsensitive Histidin-Kinasen sind außer in *Z. mays* und *A. thaliana* nur noch von *Catharanthus roseus* und *Oryza sativa* bekannt (HAN ET AL. 2004, PAPON ET AL. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine Histidin-Kinase aus Kürbis identifiziert und funktionell exprimiert (Abschnitte 4.1 und 4.2). Sequenz- und Strukturanalysen deckten große Homologien zu den bekannten Cytokininrezeptoren in *A. thaliana* und *Z. mays* auf (Abschnitt 4.3). Im Hefe-Komplementierungstest wurde die Funktion der Histidin-Kinase mit dem Namen CmCRE1 als Cytokininrezeptor nachgewiesen und eine Aussage über die Ligandenpräferenz getroffen (Abschnitt 4.4). Eine umfangreiche Transkriptanalyse zeigte unabhängig von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren eine gleichmäßige Expression des Gens auf (Abschnitt 4.5).

### 4.1 Konstruktion einer cDNA-Expressionsbibliothek

Die Konstruktion der cDNA-Expressionsbibliothek stellte die entscheidende Vorarbeit für die Isolierung von Histidin-Kinasen aus Kürbis dar. Eine Bank aus dem Hypokotyl etiolierter Keimlinge wurde gewählt, da ursprünglich besonderes Augenmerk auf Komponenten des Gibberellin-Signaltransduktionsweges lag. Im Vorfeld wurde herausgefunden, dass dieses Gewebe besonders stark auf exogen appliziertes Gibberellin A<sub>4</sub> reagiert, was auf eine hohe Fähigkeit zur Perzeption dieses Hormons hinweist (SCHMIDTKE 2000). Durch eine Größenfraktionierung der cDNA vor der Transformation konnte davon ausgegangen werden, dass kleine DNA-Fragmente wie Adapterarme, Oligo(dT)-Primer und einzelne Nukleotide abgetrennt worden waren (Abbildung 3.1). Weiterhin war die cDNA-Bank in vier Fraktionen mit unterschiedlichen Insertgrößen aufgeteilt. Dadurch wurden gezielt diejenigen Klone angereichert, die aufgrund der Größe ihrer Inserts und dem Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Histidin-Kinasen (Abbildung 3.3) am wahrscheinlichsten vollständige Gene von Histidin-Kinasen enthielten. Die in dem Alignment verglichenen Gene waren zwischen 1 900 und 3 600bp lang, weshalb die cDNA-Bank-Fraktion 4 mit Insertlängen von 1 100 bis 5 000bp als Ausgangsmaterial verwendet wurde.

### 4.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

Für die Isolierung der Histidin-Kinase aus einer cDNA-Expressionsbibliothek wurde die von ISRAEL (1993) beschriebene Methode des PCR-basierten 'Screenings' verwendet. Allerdings erfolgte keine Vereinigung von einzelnen Plaques bzw. Einzelklonen, sondern die von FRISSE (1999) beschriebene schrittweise Aufteilung einer cDNA-Bank. Zum Durchsuchen der Bank wurden degenerierte Primer entwickelt, die auf den konservierten Bereichen von fünf Histidin-Kinasen des Hybridtyps und zwei Histidin-Kinase-ähnlichen Proteinen aus *A. thaliana* und *Z. mays* basierten. CRE1/AHK4, ZmHK1 und CKI1 sind im Cytokinin-Signalweg involviert (KAKIMOTO 1996 u. 2003, YONEKURA-SAKAKIBARA ET AL. 2004), AHK1 gilt als Osmosensor (URAO ET AL. 1999) und ETR1, EIN4 und ERS2 entstammen dem Ethylen-Signaltransduktionsweg (GUO U.

#### 4.2 Isolierung einer Histidin-Kinase aus der cDNA-Expressionsbibliothek

ECKER 2004). Mit dieser Auswahl sollte gewährleistet werden, dass ein möglichst weit gefächertes Spektrum von sensorischen Histidin-Kinasen der pflanzlichen Zwei-Komponentensysteme amplifiziert werden konnte.

Die Isolierung möglichst vieler und verschiedener Histidin-Kinasen mit degenerierten Primern war nicht erfolgreich. Aufgrund des hohen Degenerierungsgrades der Primer kam es bei den PCRs zu einem verstärkten Auftreten unspezifischer Banden, die teilweise auch durch die einzelnen Primer allein entstanden. Zusätzlich verursachte die niedrige Annealingtemperatur von 45°C einen hohen Hintergrund. Trotzdem war es möglich, aus einem Gemisch von 100 000 verschiedenen Klonen in der PCR ein DNA-Fragment von ca. 620bp Länge auszumachen (Abbildung 3.4). Da es weder durch die einzelnen Primer allein amplifiziert wurde, noch in der Kontroll-PCR mit dem leeren Plasmid auftauchte, sollte dieses PCR-Fragment aus den einklonierten Inserts der cDNA-Bank herrühren. Die Sequenzanalyse des klonierten PCR-Produktes (Klon 4) zeigte, dass es sich bei der isolierten DNA tatsächlich um das 621bp große Fragment einer Hybrid-Kinase handelte, nämlich den Homologen zu dem in *A. thaliana* identifizierten Cytokininrezeptor *CRE1/AHK4* (INOUE ET AL. 2001, SUZUKI ET AL. 2001A).

Durch die Verwendung von genspezifischen Primern wurde die cDNA-Bank nun spezifisch nach dem *CRE1/AHK4*-homologen Gen durchsucht, auch um es als Modellgen für die Isolierung und funktionelle Expression von weiteren Histidin-Kinasen aus Kürbis zu verwenden. Ausgehend von einem Gemisch aus 10 000 Klonen der Kürbis-cDNA-Bibliothek konnte in nur fünf PCR-basierten 'Screening'-Runden ein Einzelklon (Klon 276) isoliert werden. Mit diesem Klon wurde das von den Primern CRE1-forward und CRE1-reverse definierte 323bp große PCR-Fragment amplifiziert und die Ähnlichkeit zu Klon 4 im Restriktionsverdau gezeigt (Abschnitte 3.2.2 und 3.2.4). Eine alternative Klonierungsstrategie mit einer DIG-markierten Sonde führte zur Isolierung eines weiteren Klons (Klon H1; Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4), der mit Klon 276 zusammen sequenziert wurde. Die Sequenzierung ergab bei beiden Klonen dieselbe cDNA-Fragmentgröße von 2 072bp und eine identische Sequenz, in der jedoch kein offenes Leseraster mit Start-codon auszumachen war. Das führte zu der Vermutung, dass mit zwei verschiedenen Methoden derselbe Klon aus der cDNA-Bibliothek isoliert wurde.

Ein Homologievergleich der Aminosäuresequenz der Klone H1 und 276 mit Protein-Datenbanken zeigte eine Homologie zu Genen, die ausschließlich für Histidin-Kinasen des

#### 4 Diskussion

Hybridtyps kodierten. Die größte Ähnlichkeit wurde zu dem Cytokininrezeptor CRE1/AHK4 festgestellt (70% Identität, 80% Ähnlichkeit). Das bestätigte die bereits bei dem 621bp großen PCR-Fragment ausgesprochene Vermutung, dass es sich bei dem isolierten Gen um einen Homologen zu CRE1/AHK4 handelt. Weiter führte die große Ähnlichkeit zu dem Schluss, dass das Genprodukt ebenfalls eine Rezeptorfunktion für Cytokinin aufweisen könnte, weshalb das isolierte Gen *CmCRE1* ('*C. maxima* cytokinin response 1') genannt wurde. Bei einem anschließend durchgeführten Alignment mit den homologen Genen *AHK2*, *AHK3* und *CRE1/AHK4* aus *A. thaliana* sowie *ZmHK1* aus *Z. mays* zeigte sich, dass die isolierten Genfragmente der Klone H1 und 276 etwa 1 000 bis 1 500bp kürzer waren als diese. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass das isolierte Gen *CmCRE1* in den beiden Klonen H1 und 276 nicht vollständig vorlag. Auch ein sich anschließendes Durchsuchen der gesamten cDNA-Bank-Fraktion 4 mittels Hybridisierung führte nicht zur Isolierung eines Gens, das länger war, als die bereits sequenzierten Klone 276 und H1 (Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Um dennoch ein vollständiges cDNA-Molekül zu erhalten, wurde entschieden, das fehlende 5'-Ende mit RACE-PCR zu isolieren (Abschnitt 2.10).

### 4.3 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung des fehlenden 5'-Endes von *CmCRE1* wurde Gesamt-RNA aus dem Spross fünf Tage alter Kürbiskeimlinge und aus den Kotyledonen sieben Tage alter Keimlinge verwendet. UEGUCHI ET AL. (2001A) haben für *CRE1/AHK4* in *A. thaliana* zwar eine hauptsächliche Expression in Wurzeln nachgewiesen, die Isolierung von *CmCRE1* aus einer cDNA-Expressionsbibliothek aus Hypokotyl beweist jedoch, dass es in Kürbiskeimlingen auch möglich ist, dieses Gen aus anderen Geweben zu isolieren. Auch NISHIMURA ET AL. (2004) beschreiben die Expression von *CRE1/AHK4* in allen Geweben fünf Tage alter *A. thaliana*-Keimlinge auf einem niedrigen Niveau. Weiterhin waren zu diesem Zeitpunkt bereits erste Expressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden, die auf eine gleichmäßige Expression dieses Gens in allen untersuchten Geweben hinwiesen. Aus diesem Grund wurde es nicht als zwingend



#### 4.3 Identifizierung der vollständigen Gensequenz mittels RACE-PCR

notwendig angesehen, für die RACE-PCR dasselbe Ausgangsmaterial zu verwenden wie für die Herstellung der cDNA-Expressionsbibliothek. Bei der Auswertung der Reaktion mittels Gelelektrophorese konnte das amplifizierte DNA-Fragment nicht anhand seiner Größe identifiziert werden, weshalb alle amplifizierten RACE-Produkte kloniert und mittels PCR untersucht wurden. Es wurden Klone mit zwei verschiedenen Inserts identifiziert und sequenziert (Klone 3 und 11), wobei sich eine starke Übereinstimmung der Sequenzen ergab. Allerdings enthielt Klon 11 an Position 2 040 seiner Sequenz einen Einschub von 137bp, die Klon 3 fehlten.

Basierend auf den Sequenzdaten für die Klone H1 und 276 (3'-Ende des Gens) und den Daten für die Klone 3 und 11 (5'-Ende) konnte die Sequenz für das vollständige Gen *CmCRE1* mit einer Gesamtlänge von 3 925bp ermittelt werden (Anhang D). Diese Sequenz schließt einen offenen Leserahmen von 2 943bp ein, der für 981 Aminosäuren kodiert. Der Vergleich der Aminosäuresequenz zeigt die Homologie zu bekannten Histidin-Kinasen auf, die entweder bewiesenermaßen oder vermutlich als Cytokininrezeptoren fungieren (Tabelle 3.2). Das erhärtete die Vermutung, dass es sich bei dem aus Kürbis isolierten homologen Gen *CmCRE1* mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls um einen Cytokininrezeptor handelt. Auf Aminosäurebasis zeigt *CmCRE1* die größte Ähnlichkeit zu CRE1/AHK4 aus *A. thaliana* (80% Ähnlichkeit und 70% Identität), einem Gen, das unabhängig voneinander zweimal als Cytokininrezeptor identifiziert wurde (INOUE ET AL. 2001, SUZUKI ET AL. 2001A). Auch zu ZmHK1 aus *Z. mays*, einem weiteren Cytokininrezeptor, dessen Funktion von YONEKURA-SAKAKIBARA ET AL. (2004) beschrieben wurde, bestehen 72% Ähnlichkeit und 57% Identität. Die Proteine AHK3 und AHK2 aus *A. thaliana* weisen 72% bzw. 69% Ähnlichkeit auf und gelten allgemein ebenfalls als Rezeptoren für Cytokinine. Allerdings konnte bis jetzt nur für AHK3 die Fähigkeit nachgewiesen werden, extrazelluläre Cytokinin-signale weiterzuleiten, indem  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *E. coli* induziert wurde (YAMADA ET AL. 2001, SPICHAL ET AL. 2004). Auch für CrCKR1 aus *C. roseus*, das eine Ähnlichkeit von 68% zu *CmCRE1* aufweist, wurde eine Funktion als Cytokininrezeptor noch nicht nachgewiesen. Die große strukturelle Ähnlichkeit spricht aber auch in diesem Fall für eine solche Funktion (PAPON ET AL. 2002). Die Analyse der einzelnen Domänen und ihrer Struktur ist ein weiteres Indiz für die nahe Verwandtschaft von *CmCRE1* zu den Histidin-Kinasen mit Cytokininrezeptorfunktion. Vergleicht man die Domänen-Struktur von *CmCRE1* in Abbildung

#### 4 Diskussion

3.17 mit den Histidin-Kinasen in *A. thaliana* in Abbildung 1.3, so ist die Ähnlichkeit insbesondere zu AHK2, AHK3 und CRE1/AHK4 auffällig. Wie diese zeigt CmCRE1 seine Membranständigkeit anhand von Transmembran-Domänen und enthält eine extrazelluläre CHASE-Domäne zur Bindung von Hormonen mit geringer molekularer Masse (ANANTHARAMAN U. ARAVIND 2001). Auf der cytosolischen Seite drückt sich die starke Ähnlichkeit durch das Vorhandensein einer empfängerähnlichen Domäne aus, die in den übrigen Histidin-Kinasen fehlten. Alle Histidin-Kinasen in *A. thaliana* enthalten jedoch die besonders stark konservierten Boxen H, N, G1, F, G2 in der Histidin-Kinase-Domäne, die essenziell für die Histidin-Kinasefunktion sind (STOCK ET AL. 2000). Durch das Vorhandensein dieser konservierten Bereiche in CmCRE1 (Anhang D) liegt seine Funktion als Histidin-Kinase nahe, auch wenn der Beweis für die Rezeptortätigkeit dieses Gens noch aussteht.

Die Sequenzanalyse des Klons 11 wies auf eine Splicing-Variante des Gens *CmCRE1* hin. Klon 11 ist mit Klon 3 nahezu identisch bis auf eine eingeschobene Sequenz von 137bp Länge, die an Position 1 422 des offenen Leserahmens von *CmCRE1* beginnt (Anhang D). Dieser Einschub von 137bp mitten in der Histidin-Kinase-Domäne (Abbildung 3.17) verschiebt den Leserahmen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich um ein Intron handelt, das vor der Translation entfernt werden muss. Vergleicht man wiederum *CmCRE1* mit *CRE1/AHK4*, so kommt man zu der Vermutung, dass das 137bp-Intron nicht das einzige in der genomischen DNA-Sequenz ist. Bei der Analyse des Chromosoms 2 von *A. thaliana* wurde die genomische Sequenz von *CRE1/AHK4* auf dem BAC('bacterial artificial chromosomes')-Klon T23K3 (GAN: AC007069; LIN ET AL. 1999) untersucht und darin die Existenz von neun Introns ausgemacht. Auch bei der Amplifizierung des 5'-Endes von *CmCRE1* in der RACE-PCR entstanden mehrere DNA-Fragmente in unterschiedlichen Größen (Abbildung 3.16). Es lässt sich durchaus vermuten, dass sich noch mehr Splicing-Varianten mit Introns in der zugrundeliegenden mRNA befanden. Die mit den RACE-Produkten transformierten *E. coli*-Zellen wurden allerdings mit einem Primerpaar im Kolonie-'Screening' identifiziert, das mit 268bp ein sehr kleines DNA-Fragment umschloss. Dadurch waren die Introns in der übrigen Sequenz nicht nachweisbar und es kann keine Aussage darüber gemacht werden, wieviele Splicing-Varianten in der RACE-PCR amplifiziert wurden.

## 4.4 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

Die funktionelle Expression im Hefe-Komplementierungstest wurde mit dem Hefestamm *sln1Δ* durchgeführt. Dieser ist defizient in dem *SLN1*-Gen, welches für einen Osmosensor in einem Zwei-Komponentensystem codiert (MAEDA ET AL. 1994). Aufgrund dieser Defizienz sind die Zellen der Mutante auf glucosehaltigem Medium letal. Die Transformation mit einem Gen, welches das Potential besitzt, die Funktion der fehlenden Histidin-Kinase *SLN1* zu ersetzen, hebt diese Letalität auf (Abbildung 1.6). Aber nur durch die Zugabe des zugehörigen Liganden ist die Hefezelle in der Lage, die erfolgreich eingebrachte Histidin-Kinase zu aktivieren und normal zu wachsen. Die funktionelle Expression von *CmCRE1* erforderte das Vorhandensein eines vollständigen Gens vom Start- bis zum Stopcodon in dem Hefestamm *sln1Δ* und dessen erfolgreiche Translation in ein voll funktionsfähiges Protein. Zu diesem Zweck erfolgte eine erneute Klonierung des Gens, da kein vollständiges *CmCRE1*-Gen aus der cDNA-Bank isoliert werden konnte und mit der RACE-PCR nur das fehlende 5'-Ende amplifiziert wurde.

### Transformation in den Hefestamm *sln1Δ*

*CmCRE1* wurde aus mRNA gewonnen, die in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Um eine ausreichende Menge DNA für die Klonierung des Gens einsetzen zu können, wurde diese in einer PCR amplifiziert. Das Klonieren von PCR-Produkten und die anschließende funktionelle Expression ist in vielen Fällen erfolgreich durchgeführt worden (INOUE ET AL. 2001, UEGUCHI ET AL. 2001A, YONEKURA-SAKAKIBARA ET AL. 2004). In dieser Arbeit wurden mit den Primern an den Enden des PCR-Fragmentes Restriktionsschnittstellen eingebracht, die im Verdau geschnitten wurden. Das entstandene Produkt wurde an den passenden Stellen in den Hefektor p413TEF einligiert (Abbildung 2.4). Dieses Ligationsprodukt wurde nun zunächst in *E. coli* exprimiert, um ausreichend große Mengen der Plasmid-Insert-Konstrukte isolieren zu können, da etwa 10 µg für eine Hefetransformation benötigt wurden (AUSUBEL ET AL. 1999).

Nach der Hefetransformation zeigte sich, dass auf den Galactoseplatten wider Erwarten keine Kolonien zu sehen waren (Tabelle 3.3), was im Allgemeinen ein Zeichen dafür ist,

#### 4 Diskussion

dass die Hefe-Zellen keine Plasmide aufgenommen haben. Allerdings wuchsen in dem Kontroll-Ansatz AHK4 Kolonien auf der Glucoseplatte mit *t*-Zeatin. Das ist nur dann möglich, wenn SLN1 durch eine aufgenommene Histidin-Kinase ersetzt wird, die im Beisein von *t*-Zeatin aktiv ist. Damit wurde deutlich, dass die Transformation erfolgreich verlaufen war, auch wenn die Kontrollplatten mit Galactose leer blieben. Der Transformationsansatz CmCRE1 wurde vollständig ausplattiert, was zu sieben Einzelkolonien auf den Platten mit Glucose und *t*-Zeatin führte (Tabelle 3.3). Um sicherzugehen, dass die Zellen dieser sieben Kolonien das funktionell aktive Gen enthalten, wurde das Wachstumsmuster von *sln1Δ* auf neuen Platten mit Selektionsmedien überprüft (Abbildung 3.19). Wie erwartet wuchsen alle Kolonien auf Galactose, was zeigte, dass die Zellen das Plasmid p413TEF aufgenommen hatten. Keine der Kolonien wuchs jedoch auf Glucosemedium ohne *t*-Zeatin. So konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Klonen immer noch um den letalen Stamm *sln1Δ* handelte. Auf den Glucoseplatten mit *t*-Zeatin dagegen wuchsen sowohl die mit CRE1/AHK4 transformierten Zellen als auch die mit CmCRE1 transformierten. Dadurch wurde nicht nur bewiesen, dass CmCRE1 in der Lage ist, die fehlende Hybrid-Kinase SLN1 in der Hefe zu ersetzen, sondern auch, dass es sich um einen Rezeptor handelt, der durch *t*-Zeatin als Liganden aktiviert wird und das Signal in die Zelle weiterleitet.

#### Charakterisierung von *CmCRE1* mit verschiedenen Pflanzenhormonen

Zur Charakterisierung des als Cytokininrezeptor identifizierten CmCRE1 wurde die Ligandenspezifität untersucht und mit der von CRE1/AHK4 verglichen. Die erste Untersuchung fand mit Vertretern unterschiedlicher Pflanzenhormonklassen statt (Abbildung 3.20). Dabei wurde deutlich, dass zwar *t*-Zeatin im Medium zum Wachstum der transformierten Hefeklone CmCRE1-1 und CmCRE1-7 führte, GA<sub>4</sub>, 24-Epibrassinolid, IAA und ABA dagegen nicht. Ebenso verhielt sich ein zum Vergleich mit ausplattierter Klon, der CRE1/AHK4 exprimierte. Das zeigt, dass der Cytokininrezeptor sehr spezifisch nur auf Cytokinine reagiert und offensichtlich nicht auf die Vertreter anderer Hormonklassen. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen zu CRE1/AHK4 in der Literatur überein, die ebenfalls mit dem Hefe-Komplementierungstest durchgeführt wurden (INOUE ET AL. 2001, UEGUCHI ET AL. 2001B).

#### 4.4 Funktionelle Expression von *CmCRE1* im Hefe-Komplementierungstest

Da die Funktion von *CmCRE1* als Cytokininrezeptor nunmehr bewiesen war, wurde in einem weiteren Versuchsansatz mit den Klonen *CmCRE1*-1 bis *CmCRE1*-7 die Ligandenpräferenz mit einigen unterschiedlichen Cytokininbestimmungen (Abbildung 3.21). Dafür wurden die natürlichen Cytokinine *t*-Zeatin, Benzyladenin und Isopentenyladenin sowie das häufig verwendete synthetische Kinetin eingesetzt. Alle Klone wuchsen deutlich auf den Glucoseplatten mit *t*-Zeatin, BA und IP, ebenso wie der zur Kontrolle transformierte Klon AHK4. Aber nur *CmCRE1*-7 zeigte zusätzlich ein eindeutiges Wachstum auf Kinetin. Im Gegensatz dazu war bei *CmCRE1*-1 überhaupt kein Wachstum auszumachen. Klon AHK4 wuchs nur sehr schlecht, was mit den Beobachtungen übereinstimmt, die UEGUCHI ET AL. (2001B) mit *CRE1/AHK4* bei demselben Test gemacht haben. Auch dort ließ sich ein deutliches Wachstum der Zellen auf Platten mit *t*-Zeatin und BA beobachten und ein eingeschränktes Wachstum auf der Platte mit Kinetin. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einem Cytokinin-induzierten  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitätstest erzielt, in dem statt der Hefemutante *sln1 $\Delta$*  ein *E. coli*-Stamm eingesetzt wurde (SPICHAL ET AL. 2004). In jenem Testsystem fehlte ebenfalls eine Hybrid-Kinase, welche durch das strukturell ähnliche *CRE1/AHK4* ersetzt wurde. Der *E. coli*-Stamm enthielt ein *cps::lacZ*-Hybridgen (SUZUKI ET AL. 2001A), welches zu einer Blaufärbung derjenigen Kolonien führte, die das Gen *CRE1/AHK4* enthielten. SPICHAL ET AL. (2004) beschrieben die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedlicher Cytokinine und zeigten, dass die Intensität der Blaufärbung mit der Hormondosis stieg. Ließ sich mit den beiden Cytokininbestimmungen *t*-Zeatin und IP schon bei einer Konzentration von  $10^{-6}$ M im Medium eine Sättigung der Blaufärbung erreichen, so benötigten die Zellen die zehnfache Menge der Verbindungen Kinetin und BA, um annähernd eine gleich hohe  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu entwickeln. Damit zeigt sich, dass der Cytokininrezeptor *CRE1/AHK4* generell sensitiv für Kinetin ist, allerdings erst in höheren Konzentrationen.

Diese Konzentrationsabhängigkeit bei der Sensitivität für Kinetin konnte auch für die Klone *CmCRE1*-1 und *CmCRE1*-7 nachgewiesen werden. In einem Versuchsansatz mit unterschiedlichen Kinetin-Konzentrationen wuchs keiner der Klone, wenn das Hormon dem Medium in einer Konzentration von  $10^{-6}$ M beigemischt wurde (Abbildung 3.22). Bei  $10^{-5}$ M Kinetin zeigte sich ein vergleichbares Wachstumsmuster wie schon in Abbildung 3.21, mit deutlichem Zellwachstum bei *CmCRE1*-7, einem etwas schwächeren bei AHK4 und gar keinem Wachstum bei *CmCRE1*-1. Erst bei einer Steigerung der Hormonkonzentrationen

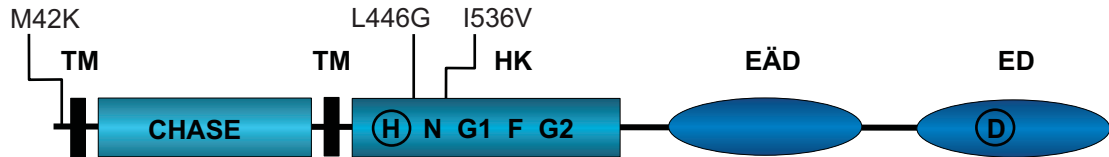
#### 4 Diskussion

tration auf  $10^{-4}\text{M}$  wuchs auch der Klon CmCRE1-1. Damit zeigt sich, dass beide Klone sensitiv für Kinetin sind, allerdings mit einem deutlichen Unterschied in der benötigten Menge. Der Unterschied in der Sensitivität der beiden Klone CmCRE1-1 und CmCRE1-7 auf Cytokinine wurde auch im Wachstum der Zellen in Abhängigkeit von der *t*-Zeatin-Konzentration deutlich (Abbildung 3.23). Die Klone CmCRE1-1 und AHK4 benötigten eine Mindestmenge von  $10^{-5}\text{M}$  *t*-Zeatin zum Wachsen, bei CmCRE1-7 reichten schon  $10^{-6}\text{M}$  aus.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Sensitivität des Klons CmCRE1-1 im Vergleich zu CmCRE1-7 auf eventuellen Unterschieden in der Nukleotidsequenz begründet liegt, wurden beide sequenziert. Bezogen auf die Nukleotidsequenz von *CmCRE1* (Anhang D) zeigen beide Klone eine Reihe von Punktmutationen. Diese basieren vermutlich auf der natürlichen Fehlerrate der *Taq*-Polymerase von 20 – 100 falsch gepaarten Basen in einer Million (SAMBROOK U. RUSSEL 2001) während der Amplifizierung der cDNA. Nicht alle Substitutionen in der Nukleotidsequenz führten allerdings auch zu Unterschieden in der Proteinsequenz. Anhand eines Alignments der homologen Histidin-Kinasen CRE1/AHK4, ZmHK1, CrCKR1 und CmCRE1 (Tabelle 3.2) wurde ermittelt, inwieweit die Mutationen konservierte und damit funktionell empfindliche Regionen von CmCRE1 betreffen. In dem Klon CmCRE1-1 wurden acht Punktmutationen identifiziert, von denen drei zu einer Substitution von Aminosäuren führten (Tabelle 3.4). Von einem Aminosäureaustausch betroffen ist ein nicht konservierter Bereich noch vor der Transmembran-Domäne und zwei Positionen in der Histidin-Kinase-Domäne. An Position 1 927 wurde in einem konservierten Bereich Leucin (L) durch Glycin (G) ersetzt und an Position 2 196 in einem nicht konservierten Bereich Isoleucin (I) durch Valin (V) (Abbildung 4.1).

In CmCRE1-7 liegen alle fünf Punktmutationen in dem Bereich zwischen 2 020 und 3 250bp, und damit zwischen den beiden phosphorylierbaren Aminosäuren Histidin in der Histidin-Kinase-Domäne und Aspartat in der Empfänger-Domäne (Tabelle 3.5). In vier Fällen führte die Mutation zu einer Substitution von einzelnen Aminosäuren. An Position 2 026, in einem konservierten Bereich der Histidin-Kinase-Domäne wurde Valin (V) durch Arginin (R) ersetzt. Die beiden betroffenen Positionen 2 778 und 2 909 liegen im wenig konservierten Bereich zwischen der Histidin-Kinase-Domäne und der empfängerähnlichen Domäne, wo der Aminosäureaustausch von Methionin (M) zu Valin (V) bzw. von Tryptophan (W) zu Cystein (C) keinen funktionell empfindlichen Bereich

### CmCRE1-1



### CmCRE1-7

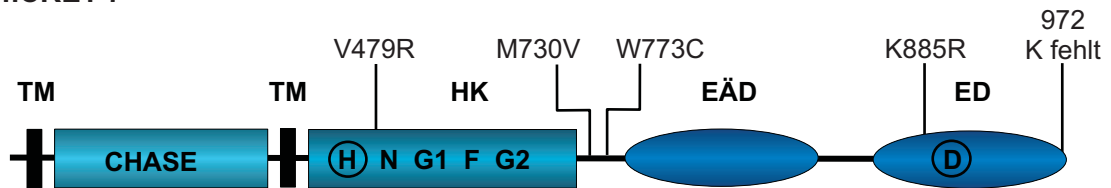


Abbildung 4.1: Durch Aminosäuresubstitution betroffene Domänen in den Hefeklonen CmCRE1-1 und CmCRE1-7.

**TM:** Transmembran-Domäne; **HK:** Histidin-Kinase-Domäne; **EÄD:** empfängerähnliche Domäne; **ED:** Empfänger-Domäne; **CHASE:** cyclases/histidine-kinase-associated sensory extracellular (mutmaßliche Domäne für die Bindung von Hormonen mit geringer molekularer Masse – ANANTHARAMAN U. ARAVIND, 2001); **H, N, G1, F, G2:** stark konservierte Boxen in der HK-Domäne. Die phosphorylierbaren Aminosäuren sind eingekreist: **H:** Histidin an Position 387 und **D:** Aspartat an Position 899 der Aminosäuresequenz. **M42K:** An der Position 42 der Aminosäuresequenz wurde Methionin durch Lysin ersetzt (ebenso die weiteren Substitutionen). Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-code angegeben.

trifft. Der letzte Austausch von Lysin (K) zu Arginin (R) wurde an Position 3 244 beobachtet, wo sich inmitten des konservierten Bereiches der Empfänger-Domäne eine nicht-konservierte Aminosäure befindet. Die ligandenbindende CHASE-Domäne ist in beiden Klonen nicht von einer Abweichung in der Proteinsequenz betroffen, was eventuell daran liegt, dass Mutationen in diesem Bereich zu einem Funktionsverlust führen könnten. Es stellt sich die Frage, welche der beschriebenen Veränderungen in der Sequenz von *CmCRE1* die verminderte Sensitivität des Klons CmCRE1-1 in Bezug auf Kinetin oder die allgemein erhöhte Sensitivität des Klones CmCRE1-7 verursacht. In beiden Klonen ist nur ein konservativer Bereich von einer Aminosäuresubstitution betroffen und in beiden Fällen liegt die Position (1 927 in CmCRE1-1 und 2 026 in CmCRE1-7) dicht beieinander am Anfang der Histidin-Kinase-Domäne. Das legt die Vermutung nahe, dass

#### 4 Diskussion

dieser Bereich in der Nachbarschaft des phosphorylierbaren Histidinrestes von entscheidender Bedeutung für die Intensität der Kinase-Aktivität des Cytokininrezeptors ist. Ob allerdings CmCRE1-1 oder CmCRE1-7 die Aktivität des Rezeptors in der Pflanze widerspiegelt, bleibt noch zu untersuchen. Eventuell zeigen auch beide Klone eine veränderte Funktion und die Aktivität des nativen Rezeptors liegt, wie bei CRE1/AHK4 zu sehen, dazwischen.

Neben den punktuellen Abweichungen wurde in CmCRE1-7 auch noch eine Deletion an der Position 3 504 beobachtet. Zehn Aminosäuren vor dem Stopcodon fehlt ein ganzes Triplet (AAG), was zum Verlust der Aminosäure Lysin am C-Terminus der Empfänger-Domäne führt. Dieser Unterschied lässt sich durch die spezifische Funktion der *Taq*-Polymerase nicht erklären und muss bereits in der mRNA der Pflanze vorgelegen haben. Ob diese Deletion allerdings einen Einfluss auf die gesteigerte Intensität der Signaltransduktion hat, ließe sich nur feststellen, wenn sie isoliert von den anderen Mutationen untersucht würde. In der Literatur sind viele Untersuchungen zur Aktivität der Cytokininrezeptoren zu finden, die mit *A. thaliana*-Mutationslinien durchgeführt wurden (z.B. SUZUKI ET AL. 2001, FRANCO-ZORRILLA ET AL. 2002, NISHIMURA ET AL. 2004). In diesen Untersuchungen wurde allerdings stets nach Funktionsverlusten gesucht und nicht nach hypersensitiven Pflanzen. Es gibt keine vergleichbaren Literaturergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen Sequenzveränderungen und erhöhter Funktion in Cytokininrezeptoren herstellen.

### 4.5 Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR

Die Keimung stellt einen enormen Wachstums- und Differenzierungsprozess dar, an dem die Cytokinine durch ihren Einfluss auf die Zellteilung, den Beitrag zur Wurzel- und Sprossentwicklung sowie der Förderung der Chloroplastenbildung maßgeblich beteiligt sind (MOK U. MOK 2001). Der Cytokininrezeptor CmCRE1 stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen dem Hormon und den zellularen Reaktionen der jungen Pflanze dar, so dass seine Expression in den sich entwickelnden Geweben einen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion ausübt. Allgemein lässt sich sagen, dass es in Kürbiskeimlingen im Alter zwischen 2 und 5 Tagen zu einer gleichbleibenden Expression des Cytokininrezeptors *CmCRE1* in einem Bereich um die 10pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA kommt (Abbildung 3.25).



#### 4.5 Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR

Die Schwankung zwischen dem niedrigsten (7,5pg) und dem höchsten (13,2pg) Einzelwert dieser Versuchsreihe lag etwa bei einem Faktor 2. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass *CmCRE1* in diesem Zeitraum unabhängig vom Entwicklungsstadium der Keimlinge immer ungefähr gleichbleibend transkribiert wird. Durch diese konstitutive Expression des Cytokininrezeptors *CmCRE1* kann das hormonelle Signal kontinuierlich zu Zellteilung, Gewebedifferenzierung und Chloroplastenbildung führen, was die rasante Entwicklung des Keimlings bedingt. Eventuell verringert sich der Transkriptgehalt in einem späteren Entwicklungsstadium der Pflanze, da in ausdifferenzierten Geweben der Bedarf an cytokiningesteuerten Zellreaktionen zurückgeht. Untersuchungen dazu stehen jedoch, auch in anderen Planzen, noch aus.

Der am besten untersuchte Cytokininrezeptor *CRE1/AHK4* in *A. thaliana* gilt allgemein als cytokininreguliert (SCHMÜLLING 2002). Da eine starke Homologie auf Aminosäurebasis zu *CmCRE1* besteht, wurde eine weitere Transkriptanalyse in Abhängigkeit der exogen applizierten Cytokinine *t*-Zeatin und Kinetin durchgeführt (Abbildung 3.26). Auch hier wurden kaum Unterschiede in der Expression festgestellt. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Expression von *CmCRE1* als Reaktion auf die exogen applizierten Cytokinine in diesem Versuchsansatz nicht hochreguliert wurde. Zur Regulierung von *CRE1/AHK4*-homologen Genen gibt es nur wenige Untersuchungen, mit denen man die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse vergleichen könnte. Eine Untersuchung befasst sich mit der Regulierung von *CRE1/AHK4* durch Kinetin unter Phosphatmangel (FRANCO-ZORRILLA ET AL. 2002). Unter Mangelbedingungen wurde eine Hochregulierung von *CRE1/AHK4* in 9 Tage alten *A. thaliana*-Keimlingen festgestellt. Das Ergebnis konnte in dieser Arbeit zu *CmCRE1* nicht bestätigt werden, wobei allerdings angemerkt werden muss, dass die Kürbiskeimlinge nicht unter Phosphatmangel angezogen wurden. Eine weitere Arbeit beschäftigt sich mit der Induzierbarkeit von *CRE1/AHK4* durch Cytokinine in Zellkulturen (CHE ET AL. 2002). Nach Wachstum auf Medium mit wenig Kinetin wurden die Calluskulturen auf IP-haltiges Medium transferiert, was in einer Hochregulierung des Transkriptes auf das dreifache resultierte. Nun ist die Cytokinin-Signaltransduktion in Callus-Kulturen, die exogen appliziertes Cytokinin obligat benötigen, um sich zu entwickeln, nicht mit dem Wachstum intakter Pflanzen zu vergleichen. Daher kann das abweichende Ergebnis der vorliegenden Arbeit, in der keine Regulierung der Expression von *CmCRE1* festgestellt wurde, auf zwei verschie-

#### 4 Diskussion

denen Erklärungen beruhen. Zum einen ist es möglich, dass *CmCRE1* abweichend von *CRE1/AHK4* tatsächlich keiner Regulierung durch Cytokinin unterliegt. Zum Anderen besteht aber auch die Möglichkeit, dass *CRE1/AHK4* nur unter Ausnahmebedingungen (Callus-Kultur, Mangelbedingungen, eventuell auch Mutationslinien) cytokininreguliert wird. Expressionsstudien, in denen die Transkriptgehalte von *CRE1/AHK4* in intakten Wildtyp-Pflanzen durch die exogene Zugabe von Cytokinin erhöht wurden, konnten nicht gefunden werden. Daher sind weitere, speziesübergreifende Untersuchungen notwendig, um direkte Vergleiche anzustellen und die Ergebnisse zu verifizieren.

Da die cDNA-Bibliothek, aus der *CmCRE1* isoliert wurde, dem Hypokotyl etiolierter Kürbiskeimlinge entstammte, wurde weiterhin untersucht, ob Etiolement einen Einfluss auf die Expression dieses Gens ausübt (Abbildung 3.27). Auch in diesem Ansatz ist eine sehr gleichmäßige Verteilung der Transkripte in den Pflanzen festzustellen, die unter Langtagbedingungen angezogen wurden (8,8 bis 11,0pg Transkript/ $\mu$ g Gesamt-RNA). Die Expressionsniveaus der zum Vergleich untersuchten etiolierten Keimlinge lagen etwa 15 bis 20% darunter. Einzig der Transkriptgehalt in den Kotyledonen etiolierter Keimlinge war mit nur 5,7pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA deutlich reduziert. Allerdings handelt es sich bei den Ergebnissen dieses Versuchsansatzes um Einzelmessungen, die nicht bestätigt wurden. Daher kann ohne weitere Untersuchungen nicht angenommen werden, dass Etiolement die Transkription des Cytokininrezeptors *CmCRE1* in den Kotyledonen herunterreguliert. Die gemessenen Werte aus den unter Langtagbedingungen angezogenen Keimlingen lassen sich jedoch direkt mit denen aus den beiden vorangegangenen Versuchsansätzen vergleichen. Da die Transkriptgehalte von *CmCRE1* in den unterschiedlichen Proben von drei unabhängigen Ernten und RNA-Präparationen immer um die 10pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA lagen, lässt sich bereits mit einiger Sicherheit sagen, dass dieses Gen in Kürbiskeimlingen bis zu einem Alter von fünf Tagen konstitutiv exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wurde in *A. thaliana* eine sehr unterschiedlich ausgeprägte Expression des homologen Gens *CRE1/AHK4* ermittelt (UEGUCHI ET AL. 2001A). Die Autoren zeigten ebenfalls anhand einer RT-PCR – allerdings ohne Quantifizierung durch einen internen RNA-Standard – dass *CRE1/AHK4* hauptsächlich in den Wurzeln und nur zu einem verschwindend geringen Teil in den oberirdischen Pflanzenteilen exprimiert wurde. Da dort allerdings ausgewachsene Exemplare von *A. thaliana* untersucht wurden und keine Keimlinge, sind die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar. In *A. thaliana*-Keimlingen

#### 4.5 Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR

wurde die Expression der *AHK*-Gene (*AHK2*, *AHK3* und *CRE1/AHK4*) mit Hilfe der 'GUS'-Färbung untersucht (NISHIMURA ET AL. 2004). Dabei handelte es sich um ein fusioniertes Konstrukt aus *AHK*-Promotor und  $\beta$ -Glucuronidasegen (*GUS*), das die Regionen der Genexpression *in situ* blau anfärbte. Die Autoren entdeckten auf diese Weise eine Expression der genannten *AHK*-Gene in allen Geweben der fünf Tage alten Keimlinge auf niedrigem Niveau mit einer hauptsächlichen Expression in meristematischem und vaskulärem Gewebe. Auch hier handelte es sich um qualitative Untersuchungen der Transkripte.

Eine Quantifizierung wurde dagegen in *Z. mays* vorgenommen, wo das Verteilungsmuster der drei *AHK*-Homologen *ZmHK1*, *ZmHK2* und *ZmHK3a* untersucht wurde (YONEKURA-SAKAKIBARA ET AL. 2004). Ein direkter Vergleich der Proteinsequenzen zeigt Homologien zwischen *ZmHK1* und *CRE1/AHK4*, *ZmHK2* und *AHK3* sowie *ZmHK3a* und *AHK2*. Auch die Expressionsmuster dieser Gene in unterschiedlichen Geweben von *A. thaliana* und *Z. mays* weisen auffällige Parallelen auf (YONEKURA-SAKAKIBARA ET AL. 2004, UEGUCHI ET AL. 2001A). *CRE1/AHK4* und *ZmHK1* werden in einzelnen Geweben sehr stark exprimiert und in anderen dagegen sehr schwach. Bei *AHK3* und *ZmHK2* kommt es zu einer sehr gleichmäßigen Verteilung auf einem mittleren Niveau, vor allem in den vegetativen Pflanzenteilen. *AHK2* und *ZmHK3a* zeigen in den meisten Geweben nur eine sehr schwache Expression. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gen *CmCRE1* lässt sich am besten dem beschriebenen Verteilungsmuster der Histidin-Kinasen *AHK3* und *ZmHK2* zuordnen, da auch *CmCRE1* in den vorliegenden Untersuchungen eine homogene Verteilung in den untersuchten Geweben zeigte. Das kann nun daran liegen, dass das Expressionsmuster von *CmCRE1* trotz der starken Homologie zu *CRE1/AHK4* und *ZmHK1* tatsächlich eher dem der Gene *AHK3* und *ZmHK2* entspricht. Eventuell verändert sich auch mit zunehmendem Alter das Expressionsmuster, denn die Transkriptanalyse in Kürbis wurde in Keimlingen vorgenommen. Dagegen hatten sowohl die Mais- als auch die *A. thaliana*-Pflanzen zum Zeitpunkt ihrer Untersuchung bereits das generative Stadium erreicht. Untersuchungen in den verschiedenen Spezies gleicher Altersstufe könnten diese Fragen beantworten. Weiterhin wäre es notwendig, zu ermitteln, ob in Kürbis auch homologe Gene zu *AHK2* und *AHK3* vorliegen, oder ob die homogene Expression von *CmCRE1* vielleicht darauf beruht, dass es in dieser Spezies keine weiteren Cytokininrezeptoren gibt, so wie es in *C. roseus* der Fall ist

#### 4 Diskussion

(PAPON ET AL. 2002). Der Transkriptgehalt von CrCKR1 ist in *C. roseus*, ebenfalls im generativen Stadium, mittels Northern Blot analysiert worden und zeigt eine nahezu gleichmäßige Expression der Histidin-Kinase in fast allen untersuchten Geweben. Die einzige Ausnahme stellten die Blüten dar, die eine deutlich höhere Transkription aufwiesen. Diese Parallele im Expressionsmuster könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich bei CmCRE1 um den einzigen Cytokininrezeptor in Kürbis handelt.

Abschließend bleibt zu sagen, dass der im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Weg zur Isolierung und Klonierung einer Histidin-Kinase aus einer cDNA-Expressionsbibliothek aus Kürbis erfolgreich beschritten worden ist. Mit einer sorgfältigen Auswahl degenerierter Primer bleibt auch die Isolierung weiterer Gensequenzen dieses Typs aus den unterschiedlichsten Pflanzenspezies aussichtsreich. Mit dem Hefe-Komplementierungstest und der kompetitiven RT-PCR stehen zwei aussagekräftige Methoden zur Verfügung, die es ermöglichen, diese isolierten Histidin-Kinasen sowohl qualitativ als auch quantitativ zu charakterisieren. Der Hefe-Komplementierungstest besticht durch die Eindeutigkeit seiner Ergebnisse. Die letalen Hefezellen überleben auf Glucose nur, wenn die eingebrachte Histidin-Kinase als Rezeptor fungiert und durch die ihr dargebrachten Liganden im Medium tatsächlich aktiviert wird. Damit ist sehr schnell der Beweis der Rezeptortätigkeit erbracht und die Spezifität der Liganden festgestellt. Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal anhand von Abstufungen in der Ligandenkonzentration gezeigt werden, dass diese Methode sich auch zur quantitativen Analyse der Sensitivität des Rezeptors eignet. Die sehr sensitive Analysemethode der RT-PCR ermöglicht eine feine Quantifizierung der Transkriptgehalte. Somit konnte belegt werden, dass *CmCRE1* vermutlich nach anderen Mustern exprimiert wird als *CRE1/AHK4* in *A. thaliana*. Das ist deshalb bedeutsam, da in *A. thaliana* erzielte Ergebnisse gerne als allgemeingültig auf andere Pflanzenspezies übertragen werden. Weiterhin lassen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen vermuten, dass Mutationen in einem konservierten Bereich der Histidin-Kinase-Domäne, in der Nähe zum phosphorylierbaren Histidinrest, zu einer veränderten Aktivität des Cytokinin-Rezeptors führen. Dies könnte einen erfolgversprechenden Ausgangspunkt darstellen, gezielt Mutationslinien mit unterschiedlicher Cytokinin-Sensitivität zu entwickeln, um so Feedback-Regulationen in der Signaltransduktionskette oder Interaktionen mit anderen Hormonen zu analysieren.

# Zusammenfassung

Basierend auf einem Alignment unterschiedlicher sensorischer Histidin-Kinasen und Histidin-Kinase-ähnlicher Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* wurden degenerierte Primer entwickelt, die zum Durchsuchen einer cDNA-Expressionsbibliothek aus dem Hypokotyl sieben Tage alter etiolierter Kürbiskeimlinge (*Cucurbita maxima*) eingesetzt wurden. Dieses 'Screening' führte zur Amplifizierung des Fragmentes einer Histidin-Kinase in *C. maxima*, welches als Muster für die Entwicklung genspezifischer Primer verwendet wurde. Mit zwei unterschiedlichen Methoden - PCR-basiertes 'Screening' und Hybridisierung mit DIG-markierter Sonde - gelang es, einen Klon aus der cDNA-Bank zu isolieren, der eine unvollständige Histidin-Kinase enthielt. Nach der Isolierung des fehlenden 5'-Endes mit RACE-PCR enthüllte die Sequenzierung eine Gesamtlänge des Gens von 3 925bp mit einem offenen Leserahmen von 2 943bp, der für 981 Aminosäuren kodierte. Der Vergleich der Aminosäuresequenz zeigte mit einer Ähnlichkeit von 80% bzw. 72% und einer Identität von 70% bzw. 57% eine Homologie zu den bekannten Cytokinin-Rezeptoren CRE1/AHK4 aus *A. thaliana* und ZmHK1 aus *Z. mays*. Da auch ein Vergleich der Domänenstruktur zu einer sehr hohen Ähnlichkeit führte, erhielt die in Kürbis identifizierte Histidin-Kinase den Namen CmCRE1 ('*C. maxima* Cytokinin Response 1').

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die aus Kürbis isolierte sensorische Histidin-Kinase über zwei verschiedene Ansätze charakterisiert. Die funktionelle Expression von CmCRE1 in dem Hefestamm *sln1Δ* bestätigte seine Fähigkeit, Cytokinin zu binden und eine Signaltransduktionskette des Typs Zwei-Komponentensystem zu aktivieren. Dabei wurde deutlich, dass zwei isolierte Hefe-Klone, die CmCRE1 exprimierten, unterschiedlich sensitiv auf verschiedene Arten und Konzentrationen von Cytokinin reagierten. Dies basiert vermutlich auf der Substitution einer Aminosäure in einer konservierten Region

## *Zusammenfassung*

nahe des phosphorylierbaren Histidinrestes. Der betroffene Bereich befindet sich in der Histidin-Kinase-Domäne, die eine entscheidende Rolle in der Phosphorylierungskette der Zwei-Komponentensysteme spielt. Ausgiebige Expressionsstudien mittels kompetitiver RT-PCR führten zu einem umfangreichen Transkriptprofil von CmCRE1 in Abhängigkeit unterschiedlicher endogener und exogener Faktoren. Die Auswertung ergab eine konstitutive Expression des Gens in unterschiedlichen Geweben und Altersstufen des untersuchten Keimlings. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von CmCRE1 in intakten Pflanzen durch Cytokinin-Applikation nicht hochreguliert wurde. Das lässt vermuten, dass dieses Gen nach anderen Mustern exprimiert wird als der homologe Rezeptor CRE1/AHK4 in *A. thaliana*, der als cytokininreguliert gilt.

# Literaturverzeichnis

ANANTHARAMAN, V., ARAVIND, L. (2001): The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eucaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem. Sci.* **26** (10), 579 – 582.

ASAKURA, Y., HAGINO, T., OHTA, Y., AOKI, K., YONEKURA-SAKAKIBARA, K., DEJI, A., YAMAYA, T., SUGIYAMA, T., SAKAKIBARA, H. (2003): Molecular characterization of His-Asp phosphorelay signalling factors in maize leaves: implications of the signal divergence by cytokinin-inducible response regulators in the cytosol and the nuclei. *Plant Mol. Biol.* **52**, 331 – 341.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1999): Short protocols in molecular biology (4. Edition). John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapur, Toronto.

BLEECKER, A.B., KENDE, H. (2000): Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 1 – 18.

BROWN, J.L., NORTH, S., BUSSEY, H. (1993): SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domain homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J. Bacteriol.* **175**, 6908 – 6915.

## Literatur

CHANG, C., KWOK, S.F., BLEEKER, A.B., MEYEROWITZ, E.M. (1993): Arabidopsis ethylene response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **162**, 539 – 544.

CHANG, C., STADLER, R. (2001): Ethylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. *Bioassays* **23**, 619 – 627.

CHE, P., GINGERICH, D.J., LALL, S., HOWELL, S.H. (2002): Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2771 – 2785.

CREELMAN, R.A., MULLET, J.E. (1997): Oligosaccharines, brassinolides and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. *Plant Cell* **9** (7), 1211 – 1223.

D'AGOSTINO, I.B., DERUERE, J., KIEBER, J.J. (2000): Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Phys.* **124**, 1706 – 1717.

DAVIS, R.W., BOTSTEIN, D., ROTH, J.R. (1980): Advanced bacterial genetics, a manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor, New York, USA.

DAVIES, P.J. ED (2004): Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

FRANCO-ZORRILLA, J.M., MARTIN, A.C., SOLANO, R., RUBIO, V., LEYVA, A., PAZ-ARES, J. (2002): Mutations at *CRE1* impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **32**, 353 – 360.

FRISSE, A. (1999): Untersuchungen zur Expression von Gibberellin-Dioxygenase Genen in Kürbiskeimlingen. Dissertation. *Math. Nat. Fakultät, Georg-August-Universität Göttingen*.



- GAN, S., AMASINO, R.M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986 – 1988.
- GREFEN, C., HARTER, K. (2004): Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta* **219**, 733 – 742.
- GUO, H., ECKER, J.R. (2004): The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 40 – 49.
- HAN, Q.M., JIANG, H.W., QI, X.P., WU, P. (2004): A CHASE domain containing protein kinase OsCRL4, represents a new AtCRE1-like gene family in rice. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **5** (6), 629 – 633.
- HANNA, Z., FREGAU, C., PREFONTAIN, G., BROUSSAU, R. (1984): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557 – 580.
- HEYL, A., SCHMÜLLING, T. (2003): Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Op. Plant Biol.* **6**, 480 – 488.
- HOSODA, K., IMAMURA, A., KATOH, E., HATTA, T., TACHIKI, M., YAMADA, H., MIZUNO, T., YAMAZAKI, T. (2002): Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* **14**, 2015 – 2029.
- HUA, J., CHANG, C., SUN, Q., MEYEROWITZ, E.M. (1995): Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science* **269**, 1712 – 1714.
- HWANG, I., SHEEN, J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383 – 389.
- INOUE, T., HIGUCHI, M., HASHIMOTO, Y., SEKI, M., KOBAYASHI, M., KATO, T., TABATA, S., SHINOZAKI, K., KAKIMOTO, T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060 – 1063.

## Literatur

ISRAEL, D.I. (1993): A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucleic Acid Research* **21** (11), 2627 – 2631.

KAKIMOTO, T. (1996): CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*. **274**, 982 – 985.

KAKIMOTO, T. (2003): Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**, 605 – 627.

KENDE, H., ZEEVART, J.A.D. (1997): The five 'classical' plant hormones. *Plant Cell* **9** (7), 1197 – 1210.

LANGE, T., ROBATZEK, S., FRISSE, A. (1997): Cloning and expression of a gibberellin 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm. *Plant Cell* **9**, 1459 – 1467.

LETHAM, D.S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Sci.* **8**, 569 – 573.

LETHAM, D.S. (1994): Cytokinins as phytohormones – sites of biosynthesis, translocation and function of translocated cytokinin. In Mok, D.W.S., Mok, M.C. eds, *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton.

LIN ET AL. (1999): Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**, 761 – 768.

LOHRMANN, J., HARTER, K. (2002): Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Phys.* **128**, 363 – 369.

MAEDA, T., WURGLER-MURPHY, S.M., SAITO, H. (1994): A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Genes Dev.* **14**, 2938 – 2943.

- MÄHÖNEN, A.P., BONKE, M., KAUPPINEN, L., RIIKONEN, M., BENFEY, P., HELARIUTTA, Y. (2001): A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Nature* **369**, 242 – 245.
- MILLER, C.O., SCOOG, F., SALTZA, vN.H, STRONG, M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1329 – 1334.
- MILLER, C.O., SCOOG, F., OKUMURA, F.S., SALTZA, vN.H, STRONG, M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1375 – 1380.
- MOHR, H., SCHOPFER, P. (1992): Pflanzenphysiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- MOK, M.C. (1994): Cytokinins and plant development – an overview. In Mok, M.C. ed, *Cytokinins – Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton.
- MOK, D.W., MOK, M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89 – 118.
- MUMBERG, D., MÜLLER, R., FUNK, M. (1995): Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119 – 122.
- NAGASHIMA, K., KASAI, M., NAGATA, S., KAZIRO, Y. (1986): Structure of the two genes for the polypeptide chain elongation factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **45**, 265 – 273.
- NAPOLI, C.A., BEVERIDGE, C.A., SNOWDEN, K.C. (1999): Reevaluating concepts of apical dominance and the control axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* **44**, 127 – 169.

## Literatur

NINFA, A.J., MAGASANIK, B. (1986): Covalent modification of the gluG product, NRI, by the gluL product, NRII, regulates the transcription of the gluALG operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (16), 5909 – 5913.

NISHIMURA, C., OHASHI, Y., SATO, S., KATO, T. TABATA, S., UEGUCHI, C. (2004): Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in arabidopsis. *The Plant Cell* **16**, 1365 – 1377.

NIXON, B.T., RONSON, C.W., AUSUBEL, F.M. (1986): Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (20), 7850 – 7854.

OKA, A., SAKAI, H., IWAKOSHI, S. (2002): His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.* **77**, 383 – 391.

PAPON, N., CLASTRE, M., ANDREU, F., GANTET, P., RIDEAU, M., CRÉCHE, J. (2002): Expression analysis in plant and cell suspension of *CrCKR1*, a cDNA encoding a histidine kinase receptor homologue in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J. Exp. Bot.* **53** (375), 1989 – 1990.

POSAS, F., WURGLER-MURPHY, S.M., MAEDA, T., WITTEN, E.A., THAI, T.C., SAITO, H. (1996): Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 'two-component' osmosensor. *Cell* **86**, 865 – 875.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., CURTIS, H. (1988): Biologie der Pflanzen. (2. Auflage) Walter de Gruyter, Berlin, New York.

REISER, V., RAITT, D.C., SAITO, H. (2003): Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.* **161**, 1035 – 1040.

RICHMOND, A.E., LANG, A. (1969): Effect of kinetin on protein content and survival of detached leaves. *Science* **125**, 650 – 651.

ROEF, L., VAN ONCKELEN, H. (2004): Cytokinin regulation of the cell division cycle. In Davies, P.J. ed, *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

SAKAKIBARA, H. (2004): Cytokinin biosynthesis and metabolism. In Davies, P.J. ed, *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual (3. Ausgabe). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SCHEREZ, B., DILAURENZIO, L., WILLEMSSEN, V., HAUSER, M.T., JANMAAT, K., WEISBEEK, P., BENFEY, P.N. (1995): Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**, 53 – 62.

SCHMIDTKE, S. (2000): Entwicklung einer Strategie zur Klonierung von Gibberellin-bindenden Proteinen aus *Cucurbita maxima* Keimlingen. Diplomarbeit. Math. Nat. Fakultät, Georg-August-Universität Göttingen.

SCHMÜLLING, T. (2002): New insights into the functions of cytokinins in plant development. *J. Plant Growth Regul.* **21**, 40 – 49.

## Literatur

SCHNEIDER-POETSCH, H.A.W., BRAUN, B., MARX, S., SCHAUMBURG, A. (1991): Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. Hypothesis on phytochrome-mediated signal transduction. *FEBS Letters* **281**, 245 – 249.

SKOOG, F., ARMSTRONG, D.J. (1970): Cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**, 359 – 384.

SPICHAL, L., RAKOVA, N.Y., RIEFLER, M., MIZUNO, T., ROMANOV, G.A., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T. (2004): Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45** (9), 1299 – 1305.

STOCK, A.M., ROBINSON, V.L., GOUDREAU, P.N. (2000): Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183 – 215.

SUZUKI, T., MIWA, K., ISHIKAWA, K., YAMADA, H., AIBA, H., MIZUNO, T. (2001A): The *Arabidopsis* sensor kinase, AHK4, can respond to cytokinin. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107 – 113.

SUZUKI, T., SAKURAI, K., UEGUCHI, C., MIZUNO, T. (2001B): Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (HPT) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 37 – 45.

SWEERE, U., EICHENBERG, K., LOHRMANN, J., MIRA-RODADO, V., BÄURLE, I., KUDLA, J., NAGY, F., SCHÄFER, E., HARTER, K. (2001): Interaction of the response regulator ARR4 with the photoreceptor phytochrome B in modulating red light signalling. *Science* **294**, 1108 – 1111.

UEGUCHI, C., KOIZUMI, H., SUZUKI, T., MIZUNO, T. (2001A): Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42** (2), 231 – 235.

- UEGUCHI, C., SATO, S., KATO, T. TABATA, S. (2001B): The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42** (7), 751 – 755.
- URAO, T., YAKUBOV, B., SATOH, R., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SEKI, M., SHINOZAKI, K. (1999): A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**, 1743 – 1754.
- URAO, T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. (2000): Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* **5**, 67 – 74.
- WERNER, T., MOTYKA, V., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10487 – 10492.
- WEST, A.H., STOCK, A.M. (2001): Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369 – 376.
- WILKINSON, J.Q., LANAHAN, M.B., YEN, H.C., GIOVANNONI, J.J., KLEE, H.J. (1995): An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. *Science* **270**, 1807 – 1809.
- YAMADA, H., SUZUKI, T., TERADA, K., TAKEI, K., ISHIKAWA, K., MIWA, K., YAMASHINO, T., MIZUNO, T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* **42** (9), 1017 – 1023.
- YONEKURA-SAKAKIBARA, K., KOJIMA, M., YAMAYA, T., SAKAKIBARA, H. (2004): Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. *Plant Phys.* **134**, 1654 – 1661.





# Anhang

## A. Behandlung des Pflanzenmaterials

**Ernte 1:** Hypokotyl 7 Tage alter etiolierter Kürbiskeimlinge für die cDNA-Bibliothek

**Anzahl:** 50 Samen  
**Quelldauer:** 3h in Nährlösung bei Licht  
**gegossen mit:** NL  
**Wachstumsdauer:** 7 Tage in Klimakammer II  
Lichteinwirkung beim Ernteprozess

**Ernte 2:** Spross 5 Tage alter Keimlinge für die RACE-PCR

**Anzahl:** 10 Samen  
**Quelldauer:** 4h in Leitungswasser  
**gegossen mit:** Leitungswasser  
**Wachstumsdauer:** 5 Tage in Klimakammer I

**Ernte 3:** Kotyledonen 7 Tage alter Keimlinge für die RACE-PCR

**Anzahl:** 10 Samen  
**Quelldauer:** 4h in Leitungswasser  
**gegossen mit:** Leitungswasser  
**Wachstumsdauer:** 7 Tage in Klimakammer I

**Ernte 4:** Kotyledonen 5 Tage alter unbehandelter Keimlinge für die Klonierung von CmCRE1 in Hefe

**Anzahl:** 100 Samen  
**Quelldauer:** 3h in Leitungswasser  
**gegossen mit:** Leitungswasser  
**Wachstumsdauer:** 5 Tage in Klimakammer I

**Ernte 5:** 2 bis 5 Tage alte Keimlinge (ganz oder in Spross und Wurzel unterteilt) für die RT-PCR.

**Anzahl:** je 10 – 12 Samen  
**Quelldauer:** 4h in Leitungswasser  
**gegossen mit:** Leitungswasser  
**Wachstumsdauer:** 2 – 5 Tage in Klimakammer I

**Ernte 6:** 5 Tage alte Keimlinge (Spross und Wurzel) mit Hormonen behandelt für die RT-PCR

**Anzahl:** Je 12 Samen pro Hormonbehandlung  
**Quelldauer:** 4h in Nährlösung (+Hormon)  
**gegossen mit:** NL (+Hormon)  
**Wachstumsdauer:** 5 Tage in Klimakammer I

**Ernte 7:** 5 Tage alte Keimlinge für die RT-PCR – Langtagbedingungen, Ernte von Wurzelspitzen, Wurzelrest, Hypokotyl, Kotyledonen und Apikalspitze

**Anzahl:** 50 Samen  
**Quelldauer:** 4h in Nährlösung  
**gegossen mit:** NL  
**Wachstumsdauer:** 5 Tage in Klimakammer I

**Ernte 8:** 5 Tage alte Keimlinge für die RT-PCR – etioliert, Ernte von Wurzelspitzen, Wurzelrest, Hypokotyl, Kotyledonen und Apikalspitze

**Anzahl:** 50 Samen  
**Quelldauer:** 4h in Nährlösung im Dunkeln  
**gegossen mit:** NL  
**Wachstumsdauer:** 5 Tage in Klimakammer II  
Lichteinwirkung beim Ernteprozess

## B. PCR-Programme

Tabelle B.1: Verwendete PCR-Programme

Name	Programmverlauf
Plasmid-DNA	3min 94°C + 35 × [30s 94°C + 30s $T_m$ <sup>1)</sup> + x min <sup>2)</sup> 72°C] + 5min 72°C + 99h 4°C
Koloniematerial	5min 94°C + 35 × [30s 94°C + 30s $T_m$ + x min 72°C] + 5min 72°C + 99h 4°C
DIG-markierung	7min 95°C + 30 × [45s 95°C + 60s $T_m$ + 2min 72°C] + 7min 72°C + 99h 4°C
RACE PCR	3min 94°C + 35 × [ 30s 94°C + 30s 60°C + 2min 68°C <sup>3)</sup> ] + 7min 68°C + 99h 4°C
Inner RACE PCR (optimiert)	3min 94°C + 35 × [ 30s 94°C + 3min 68°C ] + 7min 68°C + 99h 4°C
Klonierung	3min 94°C + 35 × [ 30s 94°C + 30s 61°C + 3min 68°C ] + 7min 68°C + 99h 4°C

## C. Primer

### Buchstabencode der degenerierten Primer:

B = C,G,T	M = A,C	V = A,C,G
D = A,G,T	N = A,C,G,T	W = A,T
H = A,C,T	R = A,G	X = A,C,G,T
K = G,T	S = C,G	Y = C,T

### Berechnung der Annealingtemperatur:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\%GC) - 650 / \text{Länge des Primers (bp)}$$

<sup>1)</sup>Die Annealingtemperatur  $T_m$  ist abhängig von den verwendeten Primern.

<sup>2)</sup>Die Länge der Elongationsphase ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (ca. 1kb/min).

<sup>3)</sup>Die Polymerase von Ambion hat ein Temperaturoptimum von 68°C.

Tabelle C.1: Verwendete genspezifische Primer für das Gen *CmCRE1*.

Name	Sequenz (5'–3')	Annealingtemperatur (in °C)
CRE1-forward	GGA AGC AAT TCC ATT CGA CAT TCG	61,0
CRE1-forw2	GGA AGC AGT TCC ATT CGA CAT TCG	62,7
CRE1-FP0a	AAT GCA GGT GAG CGA TAA CTC TG	60,6
CRE1-FP0b	GAA GTG AAA ATG CAG GTG AGC	58,8
CRE1-RP0	GAC AGT TAG CAC CAG CAA TGG	59,8
<b>RACE-primer</b>		
CRE1-outerRP	GTT GTC GTC AGC GAT TAG ATG C	60,3
CRE1-reverse	CAC GAC CAT CCA ATA CGA ATA AGC	60,7
CRE1-kontrollRP	TCC GTT GAC GTA TTC CGA GTC C	62,1
<b>Sequenzierprimer</b>		
CRE1Seq-FP	CTT TGA TGG TAA GTG TGG AGG	57,3
CRE1Seq-FP2	GGT TAA GAA TCA GAG ACG GC	57,3
CRE1Seq-FP2a	CCT GAA ATG CGG TAT GAA TGG	57,9
CRE1Seq-FP4	GCC TAC TTG TAT GTA CTC AC	55,3
CRE1Seq-FP5	ATG GCA TGG ATG CTG ATA TC	55,3
CRE1Seq-FP6	CAG TCT CGT ATA TTG AAT CG	53,2
CRE1Seq-RP	ACC ATT CAT ACC GCA TTT CAG G	58,2
CRE1Seq-RP2	GCT GCC ATG TTG ATG CTA TTG G	60,3
CRE1Seq-RP4	CTT CCA GGA TCT CCA ATT AC	55,3
CRE1Seq-RP5	ATG CTT CCT GAA TGG ATC TCC	57,9
CRE1Seq-RP6	GAA TCA CTC TTT GTG CAT ACG	55,9
<b>RT-Primer</b>		
CRE1-RT1	AAC AGG ACA GTT AG	40,4
CRE1-RT2	TGT TGG TAA CTG CTG	45,1
<b>Primer mit Restriktionsschnittstellen</b>		
CRE1-FP-Xba	NNN TCT AGA AAT GCA GGT GAG CGA TAA CTC TG	60,6
CRE1-RP-Xho	NNN CTC GAG GAC AGT TAG CAC CAG CAA TGG	59,8

Tabelle C.2: Verwendete degenerierte Primer.

Name	Sequenz (5'–3')	Degenerierungsgrad	Annealingtemperatur (in °C)
2KR-F1	CAY GAR ATN MBN ACN SC	1 024	45,5 – 60,0
2KR-F2	TNA AYD VNG TNY TNG AY	18 432	35,9 – 57,6
2KR-F3	AAY DVN GTN YTN GAY HK	27 648	35,9 – 60,0
2KR-F4	GGN GGN ACN GGN HTN GG	3 072	52,8 – 67,2
2KR-R1	CCN CCN TGN CCN DAN CC	3 072	52,8 – 67,2
2KR-R2	GTY TAC GGN BYN TAC CTR CCN AW	1 536	55,3 – 67,8
2KR-R3	CCN TAC CTR CCN HWN NA	3 072	45,5 – 60,0

Tabelle C.3: Verwendete plasmidspezifische Primer.

Name	Sequenz (5'–3')	Annealingtemperatur (in °C)
M13 forward	G TAA AAC GAC GGC CAG T	52,8
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50,3
p413TEFfor2	CGG TCT TCA ATT TCT CAA G	52,4
p413TEFrev	CTT CAG CTT GTC TAA CTC C	54,5

## D. Sequenz des Cytokininrezeptors *CmCRE1*

Der kodierende DNA-Strang der ermittelten Basensequenz mit daraus abgeleiteter Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode ist in 5' – 3'-Richtung abgebildet.

Nicht kodierende Bereiche der DNA sind in Kleinbuchstaben angegeben.

Start- und Stopcodon sind rot geschrieben.

Die Sequenz des Klons 4 beginnt bei 1 880bp und endet bei 2 501bp. Dieses Stück der Sequenz ist gelb unterlegt.

Die Sequenz der Klone H1 und 276 beginnt an Position 1 862 und endet bei 3 925bp.

Die Sequenz der Klone 3 und 11 beginnt an Position 1 und endet bei 2 232bp.

Die 'Annealingbereiche' der genspezifischen Primer sind mit roten Pfeilen jeweils über der Nukleotidsequenz markiert.

Die Restriktionsschnittstellen von *EcoRI*, *BamHI* und *HindIII* sind fett gedruckt.

## Anhang

Die beiden phosphorylierbaren Aminosäuren der Histidin-Kinase, Histidin und Arginin, sind eingekreist.

Die konservierten Blöcke H, N, G1, F und G2 in der Histidin-Kinase-Domäne sind grau unterlegt.

```
aaatTTTgagTTTTctggtTctgggtTctttcattcaggttgaagctgtttccgctcttctctgttttgTtaatg 75
      CRE1Seq-FP4
gaggaggagcctacttGtatgtactcactacaaaaagcgagctcacagcagatgagagagagagaggggaagaag 150
aataataatattttataaaaaaaggtacacaaagccagagaggaatagaggcacacatagtgggtttctgccata 225
gtgaaagagtattgggaaggagagcgatttaggagacaccaaagttatcccagaaatcgtttctgatttcaattt 300
tcttgagctccaaagaacaatcaagaaagggaaataacaatcggggggagcaattgaagaaatcccatgtgaaat 375
tctgcggtaaaagccactccggatcgatctgtggaggaccttcttctcctccatcatctctgcaaatcattggt 450
tgcatTTTccatctTTTgtgataccaggagaaactgtgggaggagtTTTcagaaagaaagtgagcgagctcaag 525
aatgttGctggttcttcaggttggcctagtTctgtgtagaggaatgaagaagaaaaggaagtgaatATGCAGGTGA 600
                                     M Q V S
CRE1-FP0b
CRE1-FP0a
GCGATAACTCTGTGGGTTTGAAGTGGAAATGAGCAAATGGGAACAACAAAGAAGGGTTACACATTGTTCAGCTA 675
  D N S V G L K W N E Q M G T T K K G Y T F V Q A N
ACAGGGCTTGGCTTAGAAAGTATCTTCTGTTCTGGATTATGGGGATGGCGTTTATCAGCATGTTAATCTATAATG 750
  R A W L R K Y L L F W I M G M A F I S M L I Y N G
CRE1Seq-FP5
GCATGGATGCTGATATCAAAGTGAAGGAGGAATGAAGTGTGGGGAGTATGTGTGAGCAGAGGGCAAGGATGTTGC 825
  M D A D I K V R R N E V L G S M C E Q R A R M L Q
AGGATCAATTCAATGTTAGTGTAAACCATGTTTCATGCCTTGGCTGTCCTTGTTCACCTTTCATTACTTCAAAA 900
  D Q F N V S V N H V H A L A V L V S T F H Y F K N
ACCTTCTGCTATTGATCAGGAACTTTTGAGAATACACAGCCAGAACTGCTTTTGAACGGCCTCTACTCAGTG 975
  P S A I D Q E T F A E Y T A R T A F E R P L L S G
CRE1Seq-RP6
GGGTGGCGTATGCACAAAGAGTGATTTCATTCGGAGAGGGATATCTTCGAAAAGCAACACGGGTGGATGATAAGAA 1050
  V A Y A Q R V I H S E R D I F E K Q H G W M I R T
CAATGGAAAAGGAACCTTCGCCGATCGAGATGAATATGCACCAGTAATATTTTCTCAAGAAACAGTCTCGTATA 1125
  M E K E P S P D R D E Y A P V I F S Q E T V S Y I
CRE1Seq-FP6
TTGAATCGTTGGATATGATGTCAGGAGAGGAGGACCGGAAAATATTTTGAGGGCTAGAGCAACAGGAAAGGCTG 1200
  E S L D M M S G E E D R E N I L R A R A T G K A V
TCTTAACAAGACCTTCAGGCTGCTGGGTTCCCATCATCTTGAGTTGTTTTGACATTTCTGTTTACAAATTCA 1275
  L T R P F R L L G S H H L G V V L T F P V Y K F K
AATTGCCATCCATACCGACTGAAGAAGAACGGATAGAAGCAACAGCAGGCTACGTTGGCGGAGCCTTTGATGTTG 1350
  L P S I P T E E E R I E A T A G Y V G G A F D V E
AGTCACTCGTGGAGAAGTTGCTTGGGCAGCTTGCAGGGAATCAGGCCATTTTGGTAAATGTATATGATGTCACGA 1425
  S L V E N L L G Q L A G N Q A I L V N V Y D V T N
ACTCTTCTGATCTTCTCGTGATGTATGGTCATCAATATCAAGATGGTGACTTGTGCTTTTACATGAGAGCAGCC 1500
  S S D L L V M Y G H Q Y Q D G D L S L S H E S S L
```

TTGATTTCGGAGATCCATTTCAGGAAGCATTGTGATGATTGTAGATATCAGCAGAGGGCTCCACATCCTGGACTG 1575  
 D F G D P F R K H L M I C R Y Q Q R A P T S W T A  
 CCCTAACTACTGCATTCTTATTCTTCGTGATCGGTTTGTTAGTTGGATATATTTTGTATGGTGCAGCAACTCACA 1650  
 L T T A F L F F V I G L L V G Y I L Y G A A T H I  
 TTGTGAAGGTTGAAGATGATTTTTCATGAAATGCAAGTACTGAAAGTTCGAGCGGAGGCTGCCGATGTAGCAAAAT 1725  
 V K V E D D F H E M Q V L K V R A E A A D V A K S  
 CCCAGTTTCTTGCAACTGTTTCTCATGAAATTAGGACACCAATGAATGGCATCCTCGGAATGCTTGCTCTGCTTC 1800  
 Q F L A T V S (H) E I R T P M N G I L G M L A L L L  
 TGGATACAGATCTAAGTTCCACACAGAAGGATTATGCTCAAAGTCCCAGGCTTGTGGAAAGGCATTGATAGCAT 1875  
 D T D L S S T Q K D Y A Q T A Q A C G K A L I A L  
 TAATAAATGAGGTTCTTGACCGGGCAAAAATTGAAGCTGGAAAGTTAGAAGTGGAAAGCAGTTCCATTTCGACATTC 1950  
 I N E V L D R A K I E A G K L E L E A V P F D I R  
 GATCAATACTTGATGACGTGCTATCTTTATTTCCGAGAAGTCCAGACAAAAGGGTCTGGAGCTGGCAGTTTGTG 2025  
 S I L D D V L S L F S E K S R Q K G L E L A V F V  
 TTTCTGATAAAGTTCCAGAAATTGTAATTGGAGATCCTGGAAGATTTCAGACAAAATATAACAAATCTTGTGGGTA 2100  
 S D K V P E I V I G D P G R F R Q I I T N L V G N  
 ACTCTGTAAAGTTTACTGAAAGAGGACATATATTTGTTAAAGTACACCTAGCTGAGAAATTCAAAAGTCTCCATGG 2175  
 S V K F T E R G H I F V K V H L A E N S K V S M D  
 ACTCGGAATACGTCACGGAATATCCGACAGTGGCTTATTCGTATTGGATGGTCGTGAATTTCAAACCTTTGAGTG 2250  
 S E Y V N G I S D S G L F V L D G R E F Q T L S G  
 GACGCGAGGCAGCCGATGATCAGAACAGTTGGGATAACTTCAAGCATCTAATCGCTGACGACAACTTCCAGTCTGA 2325  
 R E A A D D Q N S W D N F K H L I A D D N F Q S N  
 ATGCCGCTTCAAACAACCTCAGCAGTTACCAACAGGGTTGTGATCATGTTACTTTGATGGTAAGTGTGGAGGATA 2400  
 A A S N N S A V T N K G C D H V T L M V S V E D T  
 CTGGAATTGGATCCCTTTTACATGCCCAAAATCGAGTTTTCACACCTTCATGCAAGCAGATAGCTCGACCTCCC 2475  
 G I G I L L H A Q N R V F T P F M Q A D S S T S R  
 GAAATTATGGAGGGACTGGTATTGGTTTGGATATCAGCAAATGTTTAGTTGAGTTAATGGGTGGTCAGATCAACT 2550  
 N Y G G T G I G L S I S K C L V E L M G G Q I N F  
 TCATAAGCCGGCCTCAGATTGGAAGCACGTTTTCTTCACTGCTGTATTTGGAAAATGTAAGAAAACTCGATGA 2625  
 I S R P Q I G S T F S F T A V F G K C K K N S M N  
 ATGATATGAAAAAGCCCAACTCTGAAGAACTCCCCCAGTTTGTAGAGGAATGAAAGCAATAGTAGTTGATAGCA 2700  
 D M K K P N S E E L P P S F R G M K A I V V D S K  
 AACATGTACGAGCTTCTGTAAACCAGGTATCATTTGAAGAGACTTGGTATCATAGTTGAAGTCACCAATAGCATCA 2775  
 H V R A S V T R Y H L K R L G I I V E V T N S I N  
 ACATGGCAGCTTCTTTATTCAGAGAAAATGGATCCACACTGCCAAGAAACACAATCCTTCCAGATATGATCTTAG 2850  
 M A A S L F R E N G S T L P R N T I L P D M I L V  
 TTGAAAAGGACATACTAAATTCTGATGAGGAATGTGGGATCATTCATCATCTGAACTGGAAACCGAAGGTAGTT 2925  
 E K D I L N S D E E C G I I H H L N W K P N G S S  
 CGGTTAAGTTTCCAAAGCTGATCCTTCTCGCTACCAATATTGCCACTGCTGAACTAGACAAGGCAAGAGCAGCAG 3000  
 V K F P K L I L L A T N I A T A E L D K A R A A G

## Anhang

GTTTTGCAGACACCGTGATCATGAAGCCGTTGAGGGCGACTATGGTGGCTGCCTGTCTTCAACAAGTACTCGGGG 3075  
 F A D T V I M K P L R A T M V A A C L Q Q V L G V  
 CRE1Seq-FP2  
 TTAAGAATCAGAGACGGCCGAATGGTTCTGCTTTCCTCCAGAGCCTTCTCTGTGGCAAGAGAATCTTAATTGTTG 3150  
 K N Q R R P N G S A F L Q S L L C G K R I L I V D  
 ATGACAACCGAGTAAACCGTCGGGTCGCTGCAGGCGCTCTGAAGAAATTTGGTGCAGATGTTGAGTGTGCAGATA 3225  
 D N R V N R R V A A G A L K K F G A D V E C A D S  
 GCGGGAATCTGCACTGAAGTTGCTTCAGCTACCGCATAATTTTGATGCTTGCTTCATGGATATTCAAATGCCTG 3300  
 G K S A L K L L Q L P H N F D A C F M (D) I Q M P E  
 AAATGGATGGGTTTGAAGCGACTCGTCGTATCAGGACAATGGAGGTCGAGGCAAACAAAGGAGGATTGTCTGCAA 3375  
 M D G F E A T R R I R T M E V E A N K G G L S A T  
 CAGAAGGCAAACGGCCTATACCAATATTAGCAATGACTGCAGACGTGATTCATGCTACGTACGAAGAATGCCTGA 3450  
 E G K R P I P I L A M T A D V I H A T Y E E C L K  
 CRE1Seq-FP2a / CRE1Seq-RP  
 AATGCGGTATGAATGGTTACGTCTCGAAACCCCTTTGAAGAAGAAAATCTATACAAGGAAGTTGCCCGATTTTCA 3525  
 C G M N G Y V S K P F E E E N L Y K E V A R F F K  
 HindIII  
 AAAAACCATAGTcccatcaaa**aagctt**catgaatgacaagaggtcatcagctgtagagctccttttggtgggttgga 3600  
 K P \*  
 CRE1-RP0 CRE1-RT1  
 aagtaccagcaagttttgacaccattgctgggtgctaactgtcctggtgctggtgaccgaggaaccgagttcaacg 3675  
 EcoRI  
 agggcgctcgg**gaattc**tcgactgccattgagactcggggttgagctgctaccatttctaaccaactaaatatttt 3750  
 attttgactagaatgtgagtacctacctgtatactacaccagaaatatccatccccaaatggatgtataattatg 3825  
 gttgcaaggggaaggagctaaattgtaaatgctcatatttctaagacctcttctaacaacatctttatagttggttg 3900  
 gcttaggcataaaaaaaaaaaaaaaaaa 3925

Intron:

gtaggctgtatggacatcatttattttcaaataaacacgtttgctgcctatttggttacatgtcatgttaattgat 75  
 aacttcattgctttttgccatggtgatttcttcataattgaacatctatatggaaatgaag 62



## E. Originalabbildungen der RT-PCR

Für alle RT-PCR-Ansätze wurden jeweils 100ng Gesamt-RNA als Template eingesetzt. Die eingesetzte Menge an Standard-RNA variierte von Durchgang zu Durchgang und ist in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Der RT-Standard generierte eine Bande von 2 235bp, liegt also in den Abbildungen immer über der Bande des Ziel-Fragmentes (1 732bp). Die mit dem Programm 'Scion Image' (Scion Corporation) ermittelten Transkriptgehalte basieren in allen Fällen auf den RT-PCR-Ansätzen, die mit 1pg Standard-RNA angesetzt wurden. Die Einzelwerte sind in Tabellenform in den einzelnen Abschnitten angegeben.

### Legende:

St	100bp-Standard (MBI)
1kb	1kbp-Standard (Genecraft)
+	PCR-Positivkontrolle (Klon 276, 100pg Plasmid-DNA)
–	PCR-Negativkontrolle ohne Template
0	RT-Reaktion ohne Template

## Die Expression von *CmCRE1* in sich entwickelnden Kürbiskeimlingen

Es wurden 2 bis 5 Tage (2d – 5d) alte Keimlinge untersucht, die ab dem dritten Tag in Spross- (Spross) und Wurzelgewebe (Wurzel) unterteilt wurden.

Tabelle E.1: Transkriptgehalte von *CmCRE1* im Spross- und Wurzelgewebe 2 – 5 Tage alter Keimlinge (in pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA).

Spross	2d-Keimling	3d	4d	5d
1. Durchgang	9,1	10,5	11,2	10,6
2. Durchgang		8,8	7,5	9,3
<b>Mittelwert</b>	<b>9,1</b>	<b>9,7</b>	<b>9,3</b>	<b>10,0</b>
Wurzel		3d	4d	5d
1. Durchgang		12,5	10,6	11,4
2. Durchgang		10,7	10,2	13,2
<b>Mittelwert</b>		<b>11,6</b>	<b>10,4</b>	<b>12,3</b>

## Anhang

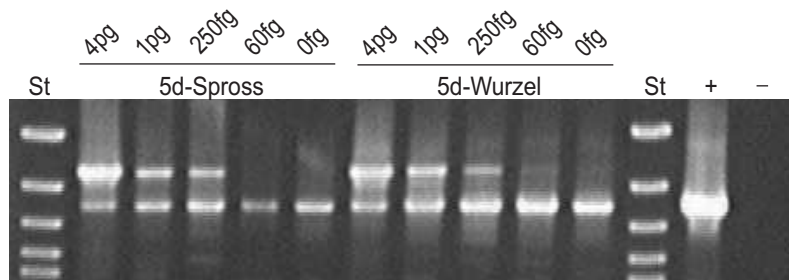
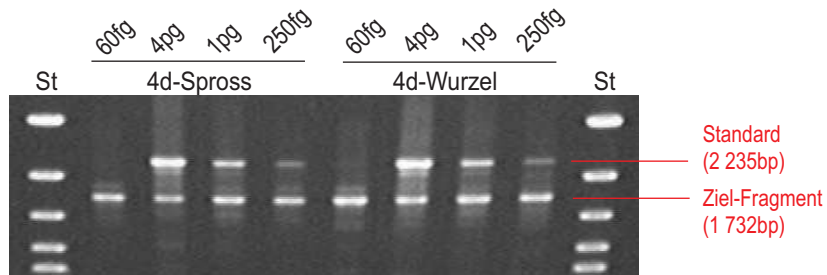
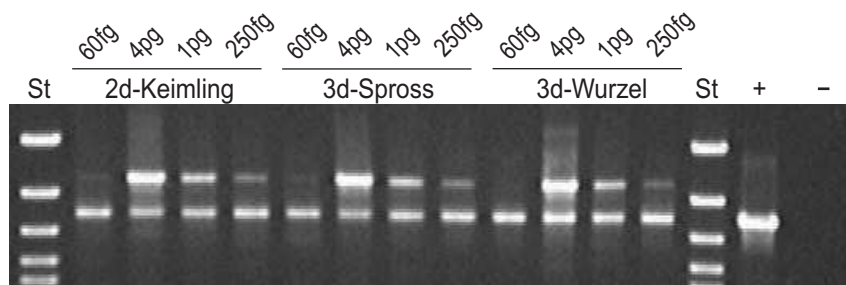


Abbildung E.1: 1. Durchgang

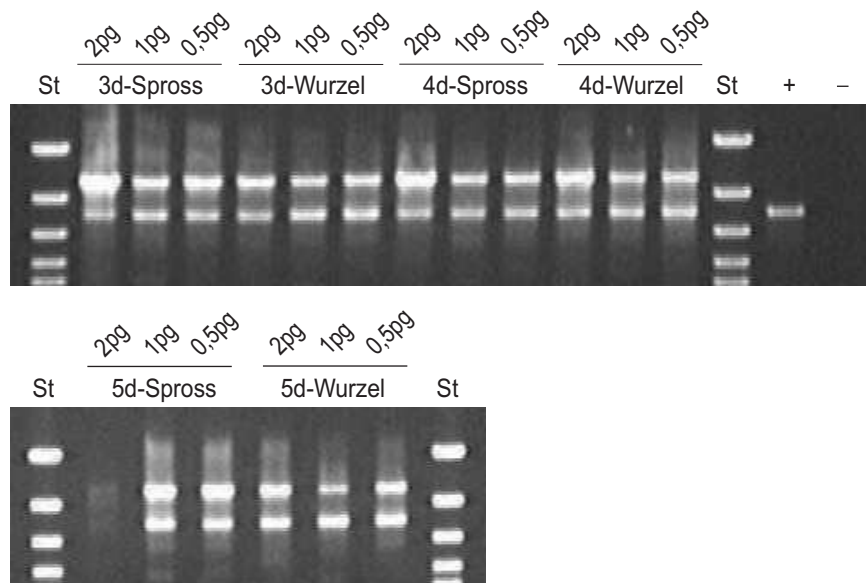


Abbildung E.2: 2. Durchgang

## Die Expression von *CmCRE1* in Abhängigkeit exogen applizierter Cytokinine

Es wurden Keimlinge untersucht, die 5 Tage lang mit oder ohne exogen appliziertem Cytokinin wuchsen. Es wurde Spross- und Wurzelgewebe getrennt untersucht.

Tabelle E.2: Transkriptgehalte von *CmCRE1* im Spross- und Wurzelgewebe 5 Tage alter cytokininbehandelter Keimlinge (in pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA).

Behandlung mit		Nährlösung	Kinetin	<i>t</i> -Zeatin
Spross	1. Durchgang	10,0	4,9	7,7
	2. Durchgang	6,9	8,3	5,8
	<b>Mittelwert</b>	<b>8,5</b>	<b>6,6</b>	<b>6,8</b>
Wurzel	1. Durchgang	12,6	13,8	11,7
	2. Durchgang	11,2	10,6	10,5
	3. Durchgang	16,1	9,7	10,4
	<b>Mittelwert</b>	<b>13,3</b>	<b>11,3</b>	<b>10,9</b>

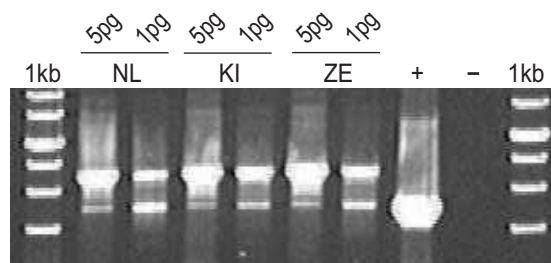


Abbildung E.3: Sprossgewebe – 1. Durchgang  
(**NL**: Nährlösung; **KI**: Kinetin; **ZE**: *t*-Zeatin.)

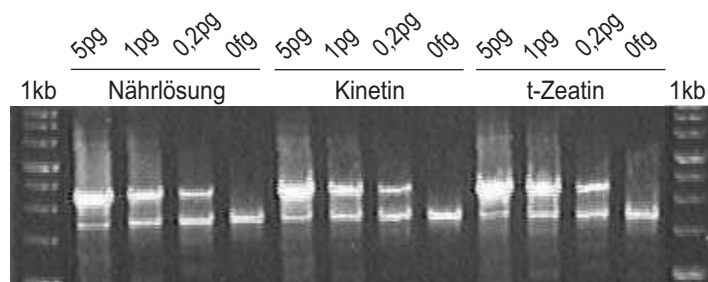


Abbildung E.4: Sprossgewebe – 2. Durchgang

## Anhang

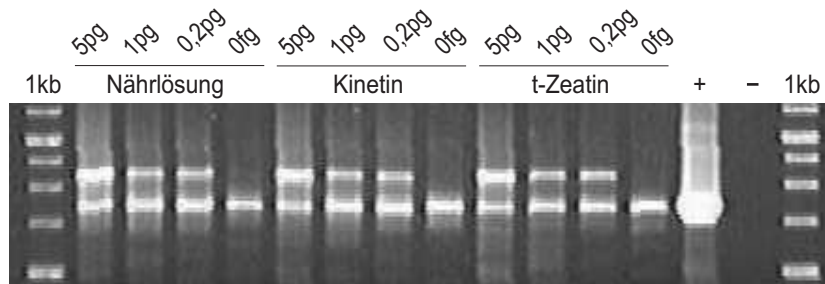


Abbildung E.5: Wurzelgewebe – 1. Durchgang

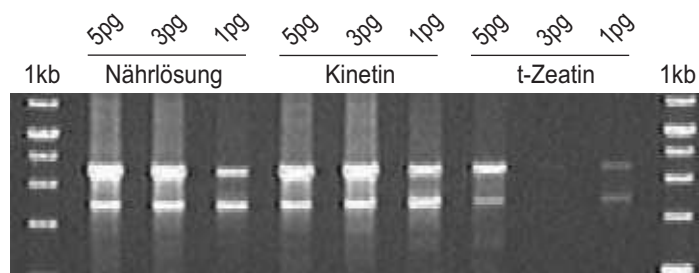


Abbildung E.6: Wurzelgewebe – 2. Durchgang

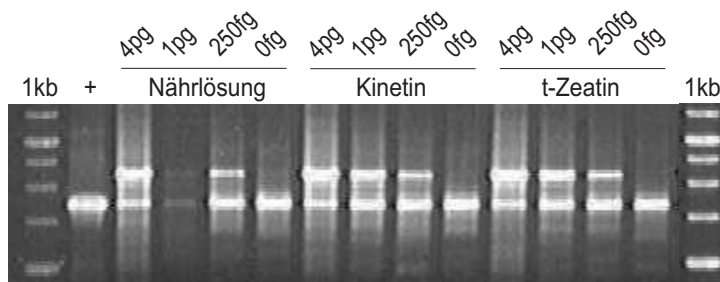


Abbildung E.7: Wurzelgewebe – 3. Durchgang

## Die lichtabhängige Expression von *CmCRE1*

Parallel wurden 5 Tage alte Keimlinge untersucht, die unter Langtagbedingungen respektive in vollständiger Dunkelheit (etiolierte Keimlinge) angezogen wurden.

Tabelle E.3: Transkriptgehalte von *CmCRE1* in 5 Tage alten Keimlingen in Abhängigkeit von der Beleuchtung (in pg/ $\mu$ g Gesamt-RNA).

Gewebe	Apikalrest	Kotyledonen	Hypokotyl	Wurzelrest	Wurzelspitze
Langtag	11,0	9,3	10,2	8,8	9,9
etioliert	9,3	5,7	8,9	7,6	7,6

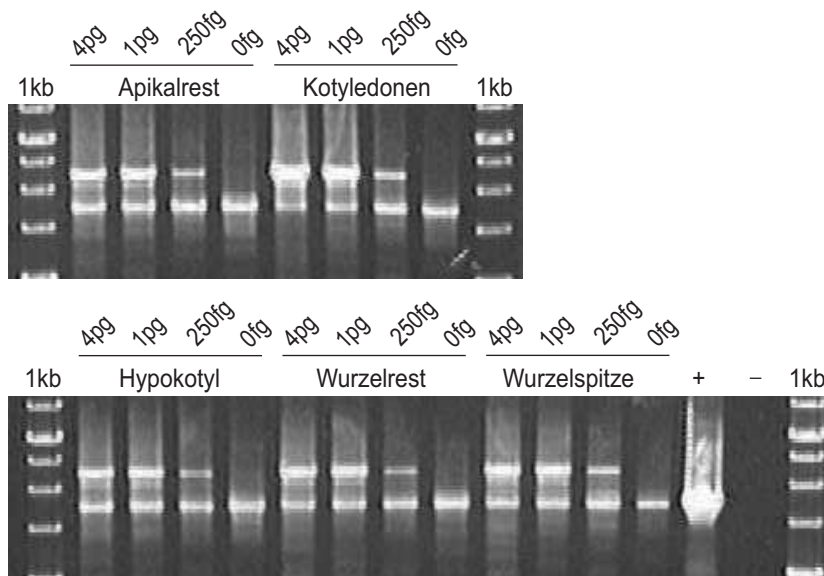


Abbildung E.8: Langtagbedingungen

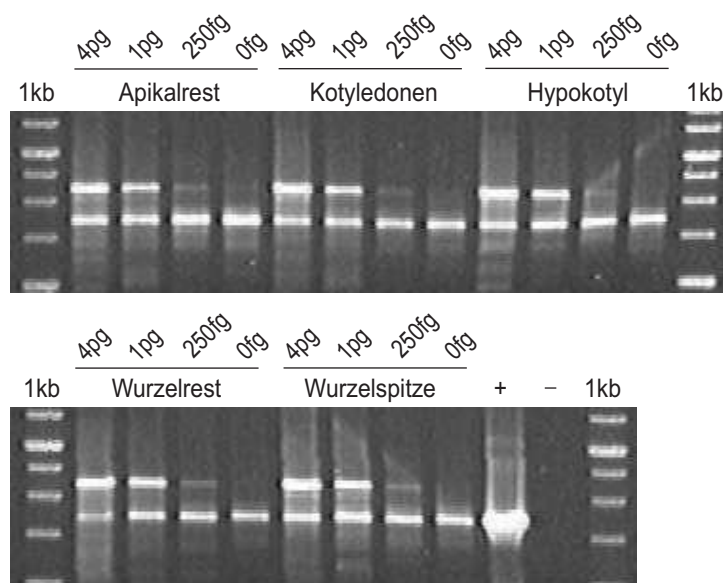


Abbildung E.9: Etiolierte Keimlinge

## F. Herstellerverzeichnis

<b>Ambion</b> (Austin, Texas, USA)	FirstChoice RLM-RACE Kit, SuperTaq Plus (Polymerase)
<b>Amersham-Pharmacia</b> , heute <b>Amersham Biosciences</b> (Freiburg)	100bp-Längenstandard, DMSO (99%ig), GNA100 (Gelträger), GeneQuant II (UV/Vis-Spektrometer), Hybond-N+ (Nylon-Membran)
<b>ATCC</b> (Manassas, VA, USA)	Hefevektor p413TEF
<b>Biometra</b> (Göttingen)	Agal Standard G45/1 (Gelträger)
<b>Biomol</b> (Hamburg)	Agarose (low EEO), Carbenicillin, DTT, EDTA, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
<b>BIO-RAD Laboratories GmbH</b> (München)	<i>E. coli</i> Pulser (Elektroporationsgerät)
<b>Deutsche Vermiculite</b> <b>Dämmstoffe GmbH</b> (Spröckhövel)	Vermiculite
<b>Difco</b> (Dreieich)	Hefe-Extrakt, LB-Agar, 'Yeast Nitrogen Base'
<b>Eppendorf</b> (Hamburg)	Thermostat 5320 (Heizblock)
<b>GeneCraft</b> (Münster)	Biotherm DNA-Polymerase, 1kb DNA-Standard
<b>Hauppauge, Computer Works GmbH</b> (Mönchengladbach)	WinTV (Software)
<b>Hellma</b> (Müllheim)	Quarzküvetten
<b>Heraeus</b> (Osterode)	Biofuge pico (Zentrifuge)
<b>Invitrogen</b> (Karlsruhe)	Fast Track 2.0 mRNA Isolation Kit, TOPO TA Cloning Kit
<b>Krupps</b> (Solingen)	Vacumiermaschine
<b>Linde</b> (Höllriegelskreuth)	flüssiger Stickstoff
<b>Macherey &amp; Nagel</b> (Düren)	NucleoSpin RNA Plant Kit
<b>MBI Fermentas</b> (St. Leon Roth)	Alkaline Phosphatase (CIAP), ATP-Lösung (100mM), dNTPs, GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, Klenow-Fragment, PEG 4 000, Restriktionsendonukleasen, T4 DNA-Ligase, Taq-Polymerase, X-Gal

<b>Merck</b> (Darmstadt)	alle weiteren Chemikalien
<b>MWG-Biotech GmbH</b> (Ebersberg)	Primus HE Thermocycler
<b>NeoLab</b> (Heidelberg)	Galactose
<b>PeqLab</b> (Erlangen)	E.Z.N.A. Cycle Pure Kit, E.Z.N.A. Gel Extraction Kit
<b>PHASE</b> (Lübeck)	Geldokumentationsgerät
<b>Promega</b> (Madison, WI, USA)	Wizard Plus Miniprep Kit
<b>QIAgen</b> (Hilden)	Plasmid Midi Kit, QIAquick Gel
<b>Roche</b> (Mannheim)	DIG DNA Labeling Mix, Anti-DIG-AP Antikörper
<b>Roth</b> (Karlsruhe)	Rotisol (100%iges EtOH), Serologische Pipetten, Trypton
<b>Samenhaus Knieke</b> (Braunschweig)	Saatgut
<b>Schütt Labortechnik</b> (Göttingen)	SANOclav (Autoklav), Schüttelwasserbäder
<b>Scion Corporation</b> (Frederick, Maryland, USA)	Scion Image (Software)
<b>Sigma</b> (Deisenhofen)	Aminosäuren, BCIP, DNaseI, Ethidiumbromid, GA <sub>4</sub> , 'Glass Beads' (425 – 600 microns), Glycerin (99%ig), LB-Base, NBT, Phenol (pH 4,3), Träger-DNA aus Lachssperma, <i>t</i> -Zeatin
<b>Sigma</b> (Osterode)	3K30 (Zentrifuge)
<b>Stratagene</b> (La Jolla, Cal., USA)	'pBluescript II XR cDNA Library Construction Kit'
<b>ThermoSpectronic</b> (Rochester, NY, USA)	Photometer Genesys10uv scanning
<b>Thermodux</b> (Wertheim)	Progene (Thermocycler)
<b>Vilber Lourmat</b> (Marne-la-Valée, F)	Bio-Link BLX-254 (Cross-Linker)
<b>Whatman International</b> (Maidstone, UK)	Filterpapier